

Aus dem
Institut für Bakteriologie und Mykologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

der
Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Einfluss verschiedener bestandsspezifischer *E. coli*-Vakzinen auf die
Eutergesundheit von Milchrindern**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Manuela Heine
aus Oschersleben

Leipzig, 2014

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Monika Krüger
Prof. Dr. Axel Sobiraj

Gutachter: Prof. Dr. Monika Krüger, Institut für Bakteriologie und Mykologie,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Axel Sobiraj, Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik,
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Axel Wehrend, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz,
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Verteidigung: 26.11.2013

Für meine Familie

und all meine Freunde

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Die Milchdrüse des Rindes	3
2.1.1 Anatomie und Physiologie	3
2.1.2 Abwehrfunktionen des Euters	3
2.1.2.1 Zitzenbarriere	4
2.1.2.2 Zelluläre Abwehr	5
2.1.2.3 Lösliche Abwehrfaktoren	6
2.1.2.4 Akut-Phase-Proteine (APP)	8
Haptoglobin	9
C-reaktives Protein (CRP)	9
2.2 Mastitis	10
2.2.1 Pathogenese	12
2.2.2 Mastitiserreger	13
2.2.2.1 Coliforme Keime und Mastitis	14
<i>Escherichia (E.) coli</i>	15
Allgemeine Eigenschaften	15
Euterpathogene <i>E. coli</i>	16
2.2.2.2 Streptokokken	20
<i>Streptococcus (Sc.) uberis</i>	20
<i>Streptococcus (Sc.) agalactiae</i>	21
<i>Streptococcus (Sc.) dysgalactiae</i>	21
2.2.2.3 Enterokokken	22
2.2.2.4 Staphylokokken	22
<i>S. aureus</i>	23
Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)	24
2.2.3 Mastitisdiagnostik	25
2.2.3.1 Somatische Zellzahl (Somatic Cell Count, SCC)	25
2.2.3.2 Akut-Phase-Proteine	27
Haptoglobin	27
C-reaktives Protein	28
2.2.3.3 Elektrische Leitfähigkeit	28

2.2.3.4 Erregernachweis	29
2.2.3.5 Endotoxinnachweis	29
2.3 Mastitisbekämpfung	30
2.3.1 Managementfaktoren	30
2.3.2 Immunmodulation	31
2.3.3 Impfung	31
2.3.3.1 <i>Streptococcus uberis</i> -Vakzinen	32
2.3.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> -Vakzinen	33
Inaktivierte Bakterien und Toxine	33
Stallspezifische inaktivierte Bakterien	34
Lebende Bakterien	35
Weitere Antigene	35
2.3.3.3 <i>Escherichia coli</i> -Vakzinen	36
<i>core-antigen</i> -Vakzinen	36
Weitere Antigene	39
Antigenkombinationen von <i>E. coli</i> mit anderen Bakterien	40
Applikationsformen	40
2.3.3.4 Adjuvantien	41
3 Tiere, Material und Methoden	43
3.1 Auswahl des Projektbetriebes	43
3.2 Beschreibung des Betriebes	43
3.2.1 Haltung und Fütterung der Tiere	43
3.2.2 Melkvorgang	43
3.2.3 Trockenstellen	44
3.3 Auswahl der Versuchstiere	44
3.4 Versuchsaufbau	44
3.4.1 Isolierung des Impfstammes von <i>E. coli</i>	45
3.4.2 Herstellung der Vakzinen	45
3.4.3 Bildung von Impfgruppen, Grundimmunisierung	47
3.4.4 Probenentnahme	47
3.4.4.1 Milchprobenentnahme	47
3.4.4.2 Blutprobenentnahme	48
3.4.5 Analytische Methoden	48
3.4.5.1 Milchproben	48
Zytologische Untersuchung der Milchproben	48

Bakteriologische Untersuchung der Milchproben	48
CRP-Bestimmung in der Milch.....	50
Endotoxinbestimmung in der Milch.....	50
3.4.5.2 Blutproben	51
Bestimmung spezifischer <i>E. coli</i> -Antikörper im Blutserum.....	51
Untersuchung von Haptoglobin im Serum	52
3.4.6 Definition von Grenzwerten für den Euterviertelgesundheitsstatus	52
3.4.7 Auswirkung der Trockenstehperiode auf den Eutergesundheitsstatus	53
3.4.8 Milchleistungsprüfung (MLP)	53
3.4.9 Auftreten von klinischen Mastitiden	54
3.5 Statistische Auswertung.....	54
3.5.1 Boxplotdiagramm	54
4 Ergebnisse	57
4.1 Versuchsablauf	57
4.2 Klinische Untersuchung	57
4.3 Untersuchung der Milchproben	57
4.3.1 Somatische Zellzahl der Milch.....	57
4.3.2 Gesamtkeimzahl.....	59
4.3.3 Erreger	60
4.3.3.1 Verteilung der Erreger.....	60
4.3.3.2 Keim-Score	61
4.3.4 CRP-Gehalt in der Milch	62
4.3.4.1 Korrelation des CRP-Gehaltes in der Milch mit anderen Parametern	64
4.3.5 Endotoxingehalt in der Milch	64
4.4 Untersuchung der Blutserumproben	66
4.4.1 Spezifische Antikörper im Blutserum.....	66
4.4.1.1 IgG ₁ -anti-LCV- <i>E. coli</i>	66
4.4.1.2 IgG ₁ -anti-SCV- <i>E. coli</i>	67
4.4.1.3 IgG ₂ -anti-LCV- <i>E. coli</i>	68
4.4.1.4 IgG ₂ -anti-SCV- <i>E. coli</i>	70
4.4.2 Haptoglobin im Serum	71
4.5 Eutergesundheitsstatus.....	71
4.6 Auswirkungen der Trockenstehperiode auf den Eutergesundheitsstatus.....	73
4.7 Auswertung der MLP-Daten.....	74
4.7.1 Laktationsverlauf	74

4.8 Auftreten von klinischen Mastitiden.....	77
5 Diskussion	79
5.1 Ziel der Arbeit.....	79
5.2 Kritische Betrachtungen der Methoden	79
5.2.1 Auswahl des Projektbetriebes	79
5.2.2 Impfregime	80
5.2.3 Untersuchungsmaterial und Untersuchungsmethoden.....	80
5.3 Diskussion der Versuchsergebnisse	82
5.3.1 Einfluss der Vakzine auf das Immunsystem	82
5.3.2 Einfluss der Vakzine auf den Eutergesundheitsstatus.....	86
5.3.3 Schlussfolgerung.....	92
6 Zusammenfassung.....	95
7 Summary	97
8 Literaturverzeichnis	99
9 Anhang	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Bildung und Funktion der Zytokine bei Euterinfektionen.....	8
Tabelle 2:	Bovine positive Akut-Phase-Proteine	10
Tabelle 3:	Kategorien der Eutergesundheit.....	11
Tabelle 4:	Auftreten von <i>E. coli</i> bei klinischer und subklinischer Mastitis	19
Tabelle 5:	Antigene von <i>S. aureus</i> -Vakzinen	35
Tabelle 6:	Feldversuche zur Wirksamkeit von J5-Vakzinen hinsichtlich der Inzidenz von klinischen Colimastitiden	37
Tabelle 7:	Keim-Scoring	48
Tabelle 8:	Häufigkeiten eines Keimnachweises; Gesamtkeimzahlen der Viertelgemelksproben im Gruppen- und Zeitpunktvergleich	57
Tabelle 9:	Verteilung der Erreger in den Viertelgemelksproben zum Zeitpunkt 1	58
Tabelle 10:	Verteilung der Erreger in den Viertelgemelksproben zum Zeitpunkt 3	58
Tabelle 11:	Score-Werte zur Pathogenität der bakteriologischen Nachweise der Viertelgemelksproben im Gruppen- und Zeitpunktvergleich.....	60
Tabelle 12:	Deskriptive Statistik zum Endotoxingehalt der Milch in Viertelgemelksproben der Versuchstiere der 5 Gruppen zu den Probennahmezeitpunkten 1, 2 und 3.....	63
Tabelle 13:	Eutergesundheitsstatus auf Viertelebene	70
Tabelle 14:	Deskriptive Statistik der Score-Werte zum Eutergesundheitsstatus zum Zeitpunkt 1 und 3.....	70
Tabelle 15:	Änderung des Eutergesundheitsstatus in der Trockenstehperiode	72
Tabelle 16:	Heilung auf Tierebene	72
Tabelle 17:	Vorkommen einer klinischen Mastitis vor Versuchsbeginn und in der Folgelaktation	76
Tabelle 18:	Zeitpunktvergleich (vor dem Trockenstellen vs. 30 Tage p. p.) der Antikörpertiter der Versuchsgruppen im Serum	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Allgemeines Schema der Impfstoffherstellung.....	45
Abb. 2: Das Boxplotdiagramm	54
Abb. 3: Somatische Zellzahlen der Viertelgemelksproben im Gruppen- und Zeitpunktvergleich: Darstellung der Zellzahl-niveaus der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3	56
Abb. 4: Häufigkeiten der Keimnachweise in den Viertelgemelksproben zu den Zeitpunkten 1 und 3	59
Abb. 5: CRP-Gehalt der Viertelgemelksproben im Gruppen- und Zeitpunktvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3	61
Abb. 6: Serumgehalt an IgG ₁ gegen LCV- <i>E. coli</i> im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3	64
Abb. 7: Serumgehalt an IgG ₁ gegen SCV- <i>E. coli</i> im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3	66
Abb. 8: Serumgehalt an IgG ₂ gegen LCV- <i>E. coli</i> im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3	67
Abb. 9: Serumgehalt an IgG ₂ gegen SCV- <i>E. coli</i> im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3	68
Abb. 10: mediane Score-Werte der Eutergesundheit zu den Zeitpunkten 1 und 3	71
Abb. 11: Zellgehalte des Gesamtgemelks laut Milchleistungsprüfungsdaten im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen im 2. Laktationsmonat und im 4. Laktationsmonat nach Versuchsende	73
Abb. 12: Zellgehalte des Gesamtgemelks laut Milchleistungsprüfungsdaten im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Medianwerte der 5 Gruppen in den einzelnen Laktationsmonaten (2. LM bis maximal 12. LM) nach Versuchsende	74
Abb. 13: Zellgehalte des Gesamtgemelks laut Milchleistungsprüfungsdaten im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zum Trockenstellen zu Versuchsbeginn und zum nächsten Trockenstellen nach Versuchsende	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
a.p.	ante partum
APP	Akut-Phase-Protein
bzw.	beziehungsweise
CMT	California-Mastitis-Test
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colony-stimulating factor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E.	Escherichia
Ec.	Enterococcus
EP	Europäische Pharmakopoe
et al.	und andere
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
g	Gramm oder Beschleunigung als Vielfaches der Erdbeschleunigung
Hp	Haptoglobin
IFN	Interferon
IgA	Immunglobuline der Klasse A
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IgM	Immunglobuline der Klasse M
IL	Interleukin
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kg	Kilogramm
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
l	Liter
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LM	Laktationsmonat
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLP	Milchleistungsprüfung
mM	Millimolar
n	Anzahl
ng	Nanogramm
NK	<i>Natural Killer</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PauA	Plasminogen-Aktivator
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PNAG	poly-N-acetyl- β -1,6Glukosamin
p.p.	post partum
rpm	Umdrehungen pro Minute
S.	Staphylococcus
SAAC	slime associated antigenic complex

Sc.	Streptococcus
SCC	Somatic Cell Count
spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	target of RNA III activating protein
u.	und
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
USA	United States of America
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

1 Einleitung

Die Eutergesundheit ist in einem Milchviehbetrieb von besonders großer Bedeutung, da Erkrankungen hohe ökonomische Verluste verursachen können (KOSSAIBATI u. ESSLEMONT 1997, SEEGERs et al. 2003, HOEDEMAKER et al. 2007). Die Milchleistung steht hiermit in einer deutlichen Wechselbeziehung. Laut WENDT et al. (1998) wird diese durch eine Eutererkrankung beeinträchtigt. Mastitiden rufen eine veränderte Zusammensetzung und somit eine Veränderung der chemophysikalischen Eigenschaften der Milch hervor (KITCHEN 1981). Dies hat eine erhebliche Bedeutung für die Verarbeitung in der Molkerei und kann zu Abzügen im Milchauszahlungspreis führen. Ein weiterer bedeutender Aspekt der Unwirtschaftlichkeit des Auftretens von Mastitiden ergibt sich aus der Tatsache, dass ca. 18 % der Milchkühe durch Eutererkrankungen und deren Folgen vorzeitig aus dem Produktionsprozess ausscheiden (KIRST 2008). Für den ökonomischen Verlust sind vor allem zu spät oder nicht erkannte Euterentzündungen verantwortlich zu machen. Dementsprechend sollte ein Hauptaugenmerk auf der Erkennung und Bekämpfung von subklinischen Mastitiden liegen. Die Bekämpfung einer Mastitis ist auch auf Herdenebene vorzunehmen, da die Erkrankung eines Einzeltieres das Erkrankungsrisiko der übrigen Tiere im Sinne eines Erregerreservoirs erhöht und andererseits die Rahmenbedingungen für die gesamte Herde auch unausweichlich das Individuum beeinflussen (DVG 2012). Die Abwehrbereitschaft der Kühe gegenüber Mastitiserregern unterliegt maßgeblich den Haltungsbedingungen. Die systemische Abwehr kann durch eine Vielzahl von einwirkenden Stressoren gesenkt werden. Bei Überschreiten eines tierindividuell determinierten Schwellenwertes kann es zu Erkrankungen kommen (SELYE 1946). Auch die lokale Abwehr kann durch Fehler in der Haltung und Melktechnik herabgesetzt werden. Bezogen auf das Einzeltier besteht die Therapie einer Eutererkrankung in der Anwendung eines Chemotherapeutikums nach strenger Indikationsstellung, um das Auftreten von Resistenzen zu minimieren (KRABISCH et al. 1999). Die Anwendung von Antibiotika zeigt jedoch nur mäßige Erfolge und steht zunehmend in der Kritik der Verbraucher, da derzeit 80 % des Einsatzes von Antiinfektiva bei Milchkühen auf Therapie und Prophylaxe von Mastitiden zurückzuführen sind (POL u. RUEGG 2007). Um effektiv die bakteriologische Heilung zu erzielen, ist es unabdingbar, dass das Immunsystem des betreffenden Tieres sich in einer Homöostase befindet. Somit sind Stressfaktoren zu minimieren und Stoffwechselstörungen zu vermeiden.

Der Trend in der Mastitistherapie und -prävention zielt generell auf die Stabilisierung und Aktivierung der körpereigenen Abwehr. In den letzten Jahren wurden weltweit vor allem gegen *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* diverse Vakzinen entwickelt, generell war hier jedoch eine hohe Variabilität der Ergebnisse zu verzeichnen. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit lag darin, den Einfluss von bestandsspezifischen *Escherichia coli*-Vakzinen auf das Abwehrsystem und das Erregervorkommen im peripartalen Zeitraum zu untersuchen und zu prüfen, ob diese Vakzinen die Immunkompetenz der Tiere steigern können.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Milchdrüse des Rindes

2.1.1 Anatomie und Physiologie

In der Embryogenese entsteht die Milchdrüse aus apokrinen Drüsen der Epidermis, wobei sie sich bei beiden Geschlechtern bis zur Geburt auf die gleiche Weise entwickelt. Unter dem Einfluss von Geschlechts- und Wachstumshormonen setzt mit Beginn der Pubertät das Wachstum der embryonal angelegten primitiven Milchgänge ein. Die endgültige Ausbildung des Euters erfolgt erst während der ersten Trächtigkeit unter Einwirkung von Hormonen. Hier entsteht das eigentliche Drüsenparenchym mit Alveolen, weiterhin wird Kolostrum gebildet (SCHNORR u. KRESSIN 2001). Das Rind besitzt in der Regel auf jeder Körperseite zwei Mammarkomplexe, auch Viertel genannt, die als abgegrenzte Drüsenteile anatomisch und funktionell unabhängig voneinander sind und mit je einer Zitze mit einem Strichkanal als Ausführungsgang ausgestattet sind. Durch züchterische Maßnahmen hat die Milchdrüse des Rindes eine starke Größenzunahme erfahren, um einer hohen Milchleistung von mehr als 10.000 kg pro Laktation gerecht zu werden. Dieser Anspruch erfordert jedoch immense Stoffwechselleistungen der Tiere. Zur Synthese von einem Liter Milch müssen 300 bis 500 Liter Blut das Euter durchfließen (GEYER 2008). Die genetische Selektion auf hohe Milchleistung hat den Nachteil einer erhöhten Infektionsgefährdung der Milchdrüse (DETILLEUX et al. 1995, FLEISCHER et al. 2001, HERINGSTAD et al. 2003, LUCZAK et al. 2009).

2.1.2 Abwehrfunktionen des Euters

Das Euter ist über Blut- und Lymphgefäße in das unspezifische und spezifische Abwehrsystems des Körpers einbezogen. Zusätzlich gibt es lokale Abwehrmechanismen wie die Barrierefunktionen von Zitze und Milchzisterne, welche das Eindringen von Erregern und Toxinen in das Hohlraumssystem des Euters verhindern können (MIELKE 1994). Gelingt einem Bakterium die Überwindung dieser anatomischen Barriere, setzt die unspezifische angeborene Abwehr, bestehend aus stationären und eingewanderten phagozytierenden Leukozyten und löslichen antimikrobiellen Faktoren wie Zytokinen, Lysozym, Laktoperoxidase-System und Laktoferrin ein. Die dritte Verteidigungsbarriere stellt die erworbene Immunität mit Abgabe von spezifischen Antikörpern aus dem Blutplasma in die Milch

dar (BURVENICH et al. 2009^A). Laut GÜRTLER u. SCHWEIGERT (2005) sowie MIELKE (1994) sind dies die Immunglobuline IgG₁, IgG₂, IgM und IgA im Eutersekret der Kuh, welche durch Komplementaktivierung und Opsonin-Aktivität wirken. Bei Entzündungen kommt es durch Zellschädigungen, Exsudation und Zirkulationsstörung zu einer Schädigung der Blut-Euter-Schranke, welche physiologisch als intensive Barriere dient und den Stoffaustausch zwischen Blut und Milch kontrolliert. Folglich kommt es in diesem Zusammenhang zu einer erhöhten Migration von neutrophilen Granulozyten in die Milch (SCHWEIGERT 2009).

2.1.2.1 Zitzenbarriere

Mit wenigen Ausnahmen erfolgen Euterinfektionen über den Strichkanal (JAIN 1979, BLOWEY u. EDMONDSON 2010). Durch die Zitzenbarriere, den ersten wichtigen Teil der Abwehr (SORDILLO u. STREICHER 2002), kann dies jedoch meist verhindert werden. Eine Hürde bei der Penetration stellt der Schließmuskel des Strichkanales dar, welcher in der Zwischenmelkzeit nahezu vollständig kontrahiert ist (ZECCONI et al. 2000). Nach dem Melken dauert es jedoch etwa 30 Minuten, bis der Schließmuskel wieder vollständig verschlossen ist. Daraus resultiert die Forderung, dass die Tiere erst nach dieser Zeit zurück zu den kontaminierten Liegeboxen sollten (BLOWEY u. EDMONDSON 2010). Mit einer höheren Anzahl an Laktationen kann sich eine längerfristige Erschlaffung der glatten Muskulatur einstellen, was u. a. eine erhöhte Mastitisinzidenz älterer Kühe erklärt (SCHALM et al. 1971, WENDT et al. 1998). Weiterhin wird vom Stratum corneum des Epithels im Strichkanal Keratin gebildet, das als eine zusätzliche mechanische Barriere funktioniert. Die Epithellagen werden dachziegelartig nach außen gerichtet und behindern einen Rückstrom von Flüssigkeit. Eine hohe Wachstumsrate im Basisbereich des Epithels sorgt für eine permanente Abschilferung der verhornenden Oberflächen, wodurch dort haftende Partikel mit dem Milchstrom ausgespült werden (WENDT et al. 1998). Das Strichkanalkeratin wirkt zudem bakteriostatisch und bakterizid (TREECE et al. 1966). Hyperkeratosen durch fehlerhaftes Maschinenmelken steigern das intramammäre Infektionsrisiko (NEIJENHUIS et al. 2001, PADUCH et al. 2012). In der Trockenstehzeit wird die Effektivität der mechanischen Abwehrfunktion durch Bildung eines vollständigen Keratinpfropfens verstärkt (NICKERSON 1987, BLOWEY u. EDMONDSON 2010). In der Phase der Kolostralmilchbildung steigt der intramammäre Druck jedoch kontinuierlich an. Dadurch kommt es zur Überdehnung des Strichkanals, was ein erhöhtes Infektionsrisiko in diesem Zeitraum

birgt (NICKERSON 1987, OLIVER u. SORDILLO 1988). Eine weitere Abwehrbarriere in der Zitze bildet die Fürstenbergsche Rosette, die am Übergang von Strichkanal zu Zitzenzisterne einen Faltenkranz und damit ein mechanisches Hindernis bildet. Zusätzlich sind hier Abwehrzellen nachzuweisen (NICKERSON u. PANKEY 1983, MIELKE 1994). Ein Eindringen von Keimen kann neben den morphologischen Merkmalen durch das mechanische Ausspülen beim Melken verhindert werden (WENDT et al. 1998).

2.1.2.2 Zelluläre Abwehr

Haben Bakterien die Zitzenbarriere passiert, übernehmen die Leukozyten der Milchdrüse die Abwehrfunktion. Der Immunstatus mit Anzahl und Aktivität der weißen Blutkörperchen entscheidet über Schweregrad und Dauer einer Euterinfektion (SORDILLO et al. 1997, BURTON u. ERSKINE 2003, SORDILLO 2005).

In erster Linie sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) an der vorerst unspezifischen Abwehr beteiligt (PAAPE et al. 2003), deren Anzahl innerhalb kurzer Zeit von weniger als 10^5 auf mehr als 10^6 pro ml Milch steigen kann (SORDILLO u. STREICHER 2002). Dies entspricht einer Erhöhung dieser Zellfraktion an Milchleukozyten von 12 bis 26 % in nichtinfizierten Eutervierteln auf bis zu 90 % (BURVENICH et al. 2009^B). Eine kontinuierliche Einwanderung der Neutrophilen aus dem Blutstrom in die Lumina von Alveolen, Milchgängen und Zisterne wird durch Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Komplementfaktoren und Prostaglandine verursacht (PERSSON et al. 1993, BAUMANN u. GAULDIE 1994). Am Zielort angekommen, phagozytieren sie und töten Bakterien nach Aktivierung durch Zytokine ab, in dem sie in gebildete Phagosomen reaktive Sauerstoffmoleküle und proteolytische Enzyme hinein sezernieren (PAAPE et al. 2003, BURVENICH et al. 2009^B). Durch bakterielle Zellwandbestandteile, die Lipopolysaccharide, wird die Apoptose der kurzlebigen neutrophilen Granulozyten verhindert (PAAPE et al. 2003). Erst nach Elimination der Erreger und Bereinigung der Infektion wird der Zelltod induziert, wobei die Zelltrümmer durch Makrophagen entsorgt werden (BURVENICH et al. 2009^B). In Milch und Gewebe von gesunden Eutervierteln sind diese langlebigen Phagozyten die dominierende Zellart (SORDILLO u. STREICHER 2002, BURVENICH et al. 2009^B). Makrophagen werden von BURVENICH et al. (2009^B) mit bis zu 58 % aller Milchleukozyten angegeben. Neben der unspezifischen Abwehrfunktion der Phagozytose durch Proteasen und Sauerstoffradikale liegt ihre Hauptaufgabe in der Freisetzung von chemotaktischen Substanzen wie

Prostaglandinen und Zytokinen, welche die Einwanderung der PMN induzieren (PERSSON et al. 1993). Nach MILLER et al. (1988) kann die Phagozytoserate der Makrophagen durch die Aktivierung mit opsonierenden Antikörpern drastisch gesteigert werden. Eine weitere wichtige Rolle spielen diese Leukozyten durch Antigenpräsentation bei der Entwicklung der spezifischen Immunantwort (FITZPATRICK et al. 1992, POLITIS et al. 1992). Sowohl neutrophile Granulozyten als auch Makrophagen sind im peripartalen Zeitraum funktionell beeinträchtigt, was u. a. eine erhöhte Mastitisinzidenz erklärt (MALLARD et al. 1998, SORDILLO u. STREICHER 2002).

Ohne Effektivitätsverlust in dieser Periode arbeiten die *Natural Killer* (NK) -Zellen, bei denen es sich um einen Anteil des angeborenen Immunsystems handelt. Sie besitzen zytotoxische Aktivität, indem sie infizierte Zellen binden und lytische Substanzen aus ihren Granula freisetzen (SORDILLO 2005).

Die erworbene Immunantwort wird durch Erkennung von Antigenen über Membranrezeptoren ausgeführt und von Lymphozyten induziert, die in gesunder Milch etwa 28 % der Leukozyten ausmachen (BURVENICH et al. 2009^B). Es müssen T- und B-Lymphozyten unterschieden werden. Eine weitere Unterteilung erfolgt in der Gruppe der T-Lymphozyten. T-Helfer-Zellen produzieren Zytokine nach Antigenpräsentation durch B-Lymphozyten oder Makrophagen, die wiederum andere Immunzellen aktivieren. Zytotoxische T-Zellen erkennen und vernichten veränderte oder zerstörte Zellen, während T-Suppressor-Zellen die Immunantwort regulieren (SORDILLO et al. 1997). Die primäre Aufgabe der B-Lymphozyten besteht in der Antikörperproduktion, weiterhin funktionieren sie als antigenpräsentierende Zellen (SORDILLO u. STREICHER 2002, SORDILLO 2005). Auch die Aktivität der Lymphozyten scheint im peripartalen Zeitraum abzunehmen, Grund hierfür könnten Hormonveränderungen sein (MALLARD et al. 1998).

2.1.2.3 Lösliche Abwehrfaktoren

Laut SORDILLO u. STREICHER (2002) sind die wichtigsten antimikrobiellen Abwehrstoffe die von den B-Lymphozyten synthetisierten Antikörper. In der Milch des Rindes sind vier verschiedene Immunglobulinklassen bekannt: IgG₁, IgG₂, IgA und IgM. Ihre Konzentrationen sind im Kolostrum, zur Etablierung einer Immunität beim Neugeborenen durch passiven Transfer, und im Sekret der infizierten Milchdrüse am höchsten. In der Milch eines gesunden Euters überwiegt der Anteil an IgG₁ (GUIDRY et al. 1980), jedoch steigt die Konzentration an IgG₂ während einer Infektion

deutlich (KORHONEN et al. 2000). Zur effektiven und schnellen Abwehr sollten ausreichend IgG₂ im Blut vorhanden sein (BURTON u. ERSKINE 2003). DETILLEUX et al. (1995) als auch MALLARD et al. (1998) erkannten einen signifikanten IgG₂-Mangel im Serum von Kühen im Geburtszeitraum, was zu einer erhöhten Mastitisinzidenz führt. Einige Tiere der Rasse Rotes Dänisches Milchrind zeigten in Untersuchungen von JENSEN u. CHRISTENSEN (1975) sogar eine genetisch bedingte Defizienz in der Synthese von IgG₂. Die Antikörper IgG₁, IgG₂ und IgM dienen als Opsonine, um eine Phagozytose durch Makrophagen oder Neutrophile zu induzieren (TARGOWSKI 1983), wobei IgM in der Milch eine eher untergeordnete Rolle spielt (RAINARD u. CAFFIN 1983). IgA hingegen agglutiniert die eingedrungenen Bakterien, um sie an einer weiteren Verbreitung und Anheftung zu hindern und ihre Toxine zu neutralisieren (KORHONEN et al. 2000).

Neben spezifisch wirkenden Antikörpern besitzt die Milchdrüse unspezifische, potenziell bakteriostatische oder bakterizide Faktoren wie das Laktoferrin, welches von Epithelzellen und Leukozyten produziert wird und durch Eisenbindung das Bakterienwachstum hemmen kann (SORDILLO u. STREICHER 2002). Weiterhin kann es, unter Freisetzung von Lipopolysacchariden, die Zellwand gramnegativer Bakterien zerstören sowie die Bildung verschiedener Zytokine regulieren.

Ein anderes antimikrobielles Protein ist das Lysozym, welches durch Zellwandschädigung vor allem grampositiver Bakterien ebenso bakterizid wirkt. Außerdem gibt es in der Milch das Enzym Laktoperoxidase, das einen Hemmeffekt auf die Keimentwicklung ausübt (SCHWEIGERT et al. 2009).

Komplementfaktoren stellen von Hepatozyten und Makrophagen synthetisierte Plasmaproteine dar, die über Opsonierung die angeborene und erworbene Immunität induzieren und die Lyse von Bakterien herbeiführen (SORDILLO u. STREICHER 2002).

Zytokine sind eine große Gruppe von löslichen Proteinen, die von verschiedenen Immunzellen, aber auch anderen Zellen, produziert werden und eine immunmodulatorische Funktion an Leukozyten und Endothelzellen ausüben (SORDILLO et al. 1997). Die Effekte und Bildungsorte dieser Mediatoren im Mastitisgeschehen sind der folgenden Tabelle (Tab.) 1 zu entnehmen.

Tab. 1: Bildung und Funktion der Zytokine bei Euterinfektionen (modifiziert nach SORDILLO u. STREICHER 2002, PETERSEN et al. 2004, SCHWEIGERT 2009)

Zytokin	Bildungsstätte	Funktion
IL-1	Makrophagen, Epithelzellen	Rekrutierung von PMN in die Milchdrüse Regulation der Produktion der APP
IL-2	T-Helfer-Zellen	Wachstum und Differenzierung von B-Lymphozyten Aktivierung der NK-Zellen Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen und der T-Suppressor-Zellen
IL-6	Makrophagen	Regulation der Produktion der APP Einwanderung ins Euter
IL-8	T-Lymphozyten Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen	Rekrutierung von PMN in die Milchdrüse
IFN- γ	T-Lymphozyten, NK-Zellen	Aktivierung der T-Lymphozyten Vermittlung der Aktivierung von PMN
TNF- α	Makrophagen, PMN, Epithelzellen	Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen an den Endothelzellen für PMN Öffnung der Blut-Euter-Schranke
CSF	Makrophagen, T-Lymphozyten, Endothelzellen	Förderung der Bildung von Phagozyten Rekrutierung in die Milchdrüse Erweiterung der bakteriziden und chemotaktischen Eigenschaften

IL = Interleukin, IFN = Interferon, TNF = Tumornekrosefaktor, CSF = Colony-stimulating factor, APP = Akut-Phase-Protein

2.1.2.4 Akut-Phase-Proteine (APP)

Im Falle des Überwindens der lokalen Abwehrmechanismen ereignet sich eine weitreichende systemische Antwort des Organismus auf Infektionen und Gewebeschädigungen. Dies wird als Akut-Phase-Reaktion bezeichnet, auch wenn sie bei akuten und chronischen Entzündungen erfolgt. Es treten Veränderungen an verschiedenen Organsystemen auf, wobei Fieber und Leukozytose die offensichtlichsten sind. Außerdem ändern sich die Konzentrationen von Akut-Phase-Proteinen (APP), einer großen Gruppe von im Blut zirkulierenden Eiweißen (GABAY u. KUSHNER 1999, CECILIANI et al. 2012). Dabei sind negative APP, deren Plasmakonzentrationen sinken, von positiven APP, deren Anzahl um mehr als 25 % ansteigt, zu unterscheiden (GABAY u. KUSHNER 1999, ECKERSALL u. BELL 2010). Als negatives APP gilt das Serumalbumin, dessen Konzentration bei allen Säugetieren im Falle einer Akut-Phase-Reaktion um bis zu 30 % abfällt. Die vermehrte Produktion der verschiedenen positiven APP ist jedoch

speziesspezifisch (PETERSEN et al. 2004) und erfolgt auf Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α in Hepatozyten (BAUMANN u. GAULDIE 1994, PETERSEN et al. 2004). Die Menge an zirkulierenden APP korreliert mit dem Schweregrad der Entzündung und dem Umfang der Gewebszerstörung, da ihre Funktion in der Wiederherstellung einer Homöostase und des Verhinderns eines mikrobiellen Wachstums im betroffenen Gewebe besteht (MURATA et al. 2004). Dies geschieht durch Bindung von schädigenden Molekülen wie Zelldebris und durch Opsonierung von pathogenen Organismen (BAUMANN u. GAULDIE 1994). ECKERSALL u. BELL (2010) teilen die positiven APP je nach Ausmaß ihres Anstieges im Serum in drei verschiedene Gruppen ein. Hierbei sind eine 100- bis 1000-fache Zunahme (Gruppe 1 = *major APP*) von einer fünf- bis zehnfachen (Gruppe 2 = *moderate APP*) bzw. ein- bis zweifachen Erhöhung (Gruppe 3 = *minor APP*) zu unterscheiden. Je stärker der Anstieg der APP ist, desto schneller werden sie abgebaut. Eine Übersicht zu den beim Rind relevanten APP gibt Tabelle 2.

Haptoglobin

Das Haptoglobin ist beim Rind ein *major APP*, dessen Serumkonzentrationen nach einer Infektion von weniger als 20 mg/l auf mehr als 2 g/l ansteigen kann (ECKERSALL u. BELL 2010). Seine Funktion besteht vor allem in der Bindung von freiem Hämoglobin während intravaskulärer Hämolyse, um oxidative Schäden an Geweben zu verhindern. Weiterhin wirkt es bakteriostatisch, da das gebundene Eisen nicht für das Wachstum von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, zur Verfügung steht (EATON et al. 1982). Außerdem sind antiinflammatorische, protektive und angiogenetische Effekte des Haptoglobins zu nennen (CECILIANI et al. 2012).

C-reaktives Protein (CRP)

Das C-reaktive Protein wurde 1930 von TILLET u. FRANCIS im Blut von Humanpatienten entdeckt, welche an einer Pneumokokkeninfektion erkrankt waren. Seinen Namen erhielt es aufgrund der Fähigkeit das C-Polysaccharid der Kokken zu binden. Weitere, auch veterinärmedizinisch relevante biologische Funktionen liegen in der Komplementaktivierung und Opsonierung (PETERSEN et al. 2004). In der Humanmedizin stellt es einen verlässlichen Entzündungsmarker dar (GABAY u. KUSHNER 1999).

MAUDSLEY et al. (1987) konnten das CRP erstmals im bovinen Serum nachweisen. Ob es sich dabei um ein APP handelt, ist jedoch umstritten. Der Nachweis im Serum von Rindern findet keine Verwendung, wird jedoch bei anderen Haustierspezies regelmäßig durchgeführt (ECKERSALL u. CONNER 1988, MURATA et al. 2004, PETERSEN et al. 2004).

Tab. 2: Bovine positive Akut-Phase-Proteine (nach ECKERSALL u. BELL 2010 und CECILIANI et al. 2012)

Akut-Phase-Protein (APP)	Gruppe
Haptoglobin (Hp)	1
Serum-Amyloid A (SAA)	1
Mammary associated serum amyloid A3 (MSAA3)	1
α 1 Acid glycoprotein (AGP)	2
Lipopolysaccharide binding protein (LBP)	2
Caeruloplasmin	2/3
Fibrinogen	2
Fetuin (α 2 HS glycoprotein)	2
α 1 Anti proteinase (anti trypsin)	3

2.2 Mastitis

Laut WENDT et al. (1998) ist eine Mastitis definiert als entzündliche Veränderung eines oder mehrerer Euterviertel, die meist durch mikrobielle Erreger verursacht wird. Die Milchleistung kann dabei zeitlich begrenzt, aber auch dauerhaft vermindert sein, wenn eine akute klinische Entzündung in ein chronisches Stadium mit Zubildung von Bindegewebe übergeht und die Laktogenese in den entsprechenden Eutervierteln versiegt. Damit verbunden kann es bei allzu starkem Leistungsabfall auch zum Abgang der Tiere kommen. Noch viel höher sind jedoch die Milchverluste durch subklinische Mastitiden, da diese weitaus häufiger in Milchviehherden vorkommen. Durch eine veränderte Zusammensetzung der Milch mit verminderten Laktose-, Kasein- und Fettgehalten (KITCHEN 1981, HARMON 1994) entstehen große Produktionsausfälle. Laut FEHLINGS (2009) sind 90 % aller in einem Bestand auftretenden Euterentzündungen subklinischer Natur.

Ein Euterviertel ist als gesund einzustufen, wenn bei der klinischen Untersuchung äußerlich keine pathologischen Veränderungen vorzufinden sind und auch das

entsprechende Milchsekret in der sensorischen, zytologischen und bakteriologischen Prüfung den Normwerten entspricht. Milch eines gesunden Euterviertels ist frei von euterpathogenen Keimen und überschreitet die Zahl von 100.000 Zellen/ml nicht (DVG 2012).

Der Sachverständigenausschuss „Subklinische Mastitis“ der DVG (2012) definierte darüber hinaus in Anlehnung an Veröffentlichungen des internationalen Milchwirtschaftsverbandes (International Dairy Federation, IDF 1967) verschiedene Kategorien der Eutergesundheit anhand der zytologischen und mikrobiologischen Befunde, da keine scharfe Abgrenzung zwischen gesundem und krankem Euterviertel gefunden werden konnte. Hierbei wird die normale Sekretion von einer latenten Infektion unterschieden, bei der zwar ein Mastitiserregernachweis erfolgt, die somatische Zellzahl (Somatic Cell Count, SCC) sich jedoch im physiologischen Bereich bewegt. Bei einer unspezifischen Mastitis handelt es sich um eine weitere Kategorie, bei der im Milchsekret keine Mastitiserreger nachgewiesen werden, die Zellzahl jedoch über 100.000 Zellen/ml hinausgeht. Erst bei zusätzlich positiver mikrobiologischer Untersuchung der Milch wird von einer echten Milchdrüsenentzündung gesprochen (siehe Tab. 3). Sind äußerlich keine Symptome erkennbar, liegt eine subklinische Mastitis vor. Bei Untersuchungen von TENHAGEN et al. (2006) und KIRST et al. (2009) waren 26,4 % bzw. 24,6 % ihrer Milchproben von klinisch gesunden Kühen mit Mastitiserregern kontaminiert. SCHWARZ et al. (2010) wiesen in 83 % von 615.187 Proben aus Hessen mit SCC über 100.000 Zellen/ml pathogene Keime nach.

Tab. 3: Kategorien der Eutergesundheit laut DVG (2012), in Anlehnung an IDF (1967)

	Euterpathogene Keime	
Zellen pro ml Milch	+	-
< 100.000 Zellen/ml	Latente Infektion	Eutergesund
> 100.000 Zellen/ml	Mastitis	Unspezifische Mastitis

Eine klinisch manifeste Mastitis kann laut DVG (2012) geringgradig sein, wenn einzig allein eine Veränderung des Milchsekretes mit Flockenbildung vorliegt oder aber auch mittel- bis hochgradig, wenn zusätzlich zur makroskopisch veränderten Milch Entzündungssymptome des Euters wie Umfangsvermehrung, vermehrte Wärme und

Schmerz bestehen. In diesem Fall zeigen die meisten Tiere Allgemeinstörungen, verbunden mit Fieber.

GERNAND et al. (2012) ermittelten in Thüringen, dass 34,6 % der 19.870 in der Untersuchung erfassten Tiere mindestens eine klinische Mastitis im Verlauf einer Laktation durchliefen. Die Inzidenz stieg mit der Anzahl der Abkalbungen. Ähnliche Ergebnisse erzielten LUCZAK et al. (2009) in Baden-Württemberg. 30,2 % pluripare und 10,1 % primipare Rinder wiesen während einer Laktation mindestens eine klinische Mastitis auf. Nach REINECKE (2007) blieben nur 64,9 % aller Erstkalbinnen in Mitteldeutschland bis zum Ende der ersten Laktation eutergesund, 19,3 % der untersuchten Tiere erkrankten im Zeitraum von kurz vor bis einen Monat nach der Abkalbung an einer klinischen Mastitis.

2.2.1 Pathogenese

Bei der Euterinfektion handelt es sich um einen komplexen polyfaktoriellen Prozess, da es erst bei Schwächung der Körperabwehr, bei Vorschädigung des Euters auf mechanischem, toxischem oder chemischem Wege oder bei zu starker Umweltbelastung zu einer Infektion kommen kann (WENDT et al. 1998).

KRÖMKER (2009) unterschied zwischen einer Neuerkrankung, welche nur durch plötzliche Vermehrung der Infektionserreger im Stall oder durch Verschlechterung der Zitzenabwehr passieren kann und einer klinischen Exazerbation einer bestehenden Infektion durch exogene und endogene Stressoren. Um stressverursachende Insulte handelt es sich bei Futterumstellungen und Umstellungen, welche meist in der sensiblen Transitphase um den Geburtszeitpunkt herum vorgenommen werden (KRÖMKER 2009). Aber auch zahlreiche weitere hormonelle, metabolische und zytologische Umstellungsprozesse verursachen eine Labilität des Abwehrsystems im Zeitraum der Früh-laktation, wodurch es zu deutlich mehr Neuinfektionen kommt als zu späteren Zeitpunkten der Laktation (DVG 2012).

Sonstige prädisponierende Faktoren während der Laktation sind Allgemeinstörungen der Kuh und Erkrankungen anderer Organsysteme als der Milchdrüse, die die Körperabwehr schwächen und eine Erregerstreuung verursachen können.

Zudem beschreibt SCHULZ (1994) Euter- und Zitzenverletzungen sowie die genetische Heritabilität als primär an die Kuh gebundene Faktoren, die zu einer Mastitis führen können. Weiterhin werden Prädispositionen aus Nutzung und Haltung wie Fehler in der Melktechnik und Melkhygiene, fehlerhafte Haltungsbedingungen mit

starker Verschmutzung und Verletzungsgefahr sowie Fütterungsfehler aufgeführt. Auch sehr niedrige Zellzahlen in der Milch werden als Risikofaktor für eine Mastitis aufgeführt (SURIYASATHAPORN et al. 2000).

Die prädisponierenden Faktoren, die Pathogenität des Erregers, der Funktionszustand der Milchdrüse und der Blut-Euter-Schranke sowie der körpereigenen Abwehrmechanismen bestimmen die Ausprägung einer Mastitis (BURVENICH et al. 2009^C). Dabei sind verschiedene Infektionswege zu berücksichtigen. Die häufigste Form einer Infektion erfolgt über den galaktogenen Weg. Dabei dringen Bakterien über den Strichkanal in die Milchdrüse ein, vermehren sich und lösen somit eine Entzündung aus. Möglich ist auch eine hämatogene Infektion. SEFFNER u. SCHULZ (1994) führen als Erreger, die diesen Weg bevorzugen, Mykobakterien, Brucellen und Listerien, aber auch *Escherichia coli* als Umweltkeim auf. Dieses Enterobakterium kann durch seine Toxine zur Lockerung der Blut-Euter-Schranke beitragen und somit bei Dysbiosen des Darmes und Septikämien zu einer Mastitis führen. Eine weitere und ebenfalls seltenere Möglichkeit der Infektion bietet der lymphogene Weg, wobei Eintrittsorte der Keime meist Euterhautwunden sind.

2.2.2 Mastitiserreger

Bei den bakteriellen Mastitiserregern hat sich eine Einteilung in infektiöse kuh-assoziierte und umwelt-assoziierte Erreger als vorteilhaft erwiesen (HOEDEMAKER et al. 2007, GEORGE et al. 2008, BLOWEY u. EDMONDSON 2010, DVG 2012). Zu der ersten Gruppe, deren Reservoir infizierte Tiere darstellen, und demzufolge eine Übertragung während des Melkens stattfindet, zählen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* und Mykoplasmen. In die zweite Gruppe gehören Umweltkeime wie coliforme Bakterien, Enterokokken und *Streptococcus uberis*, die jederzeit, vor allem jedoch zwischen den Melkzeiten, zu einer Infektion führen können. GEORGE et al. (2008) gliedern weiterhin noch *Corynebacterium bovis* und *Enterobacter aerogenes* ein. Die Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) werden häufig in eine dritte Gruppe eingeteilt, die als opportunistische Keime, welche Hautbesiedler sind, beschrieben werden.

Weitere sporadische oder endemische Mikroorganismen, welche eine Mastitis verursachen können, sind laut DVG (2012) *Trueperella pyogenes*, Hefen, Prototheken und Nocardien. WENDT et al. (1998) führten darüber hinaus

Mykobakterien, Chlamydien, Pseudomonaden und *Aspergillus spp.* als mögliche Mastitisserreger an.

Eine weitere Einteilung der Mastitisserreger kann in Major- und Minorpathogene vorgenommen werden. Infektionen mit Majorpathogenen, zu denen *Staphylococcus aureus*, Streptokokken und die umwelt-assoziierten Erreger zählen, führen meist zu klinischen Mastitiden. KNS und Corynebakterien sind Minorpathogene und verursachen eher Euterentzündungen subklinischer Natur (HARMON 1994).

2.2.2.1 Coliforme Keime und Mastitis

Der Ausdruck „coliform“ wurde geprägt, um eine Gruppe von lactosefermentierenden Enterobakterien zu beschreiben, welche phänotypisch kaum von dem zuerst entdeckten Mikroorganismus *Escherichia coli* zu unterscheiden waren (FENG et al. 2002). Bei den coliformen Bakterien, welche dementsprechend die Gattungen *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* und *Serratia* umfassen (GREEN u. BRADLEY 2002), handelt es sich um klassische Umweltkeime, da diese zur physiologischen Darmflora der Warmblüter gehören und somit regelmäßig ausgeschieden werden (SELBITZ 2002). Das Risiko der Entstehung einer Mastitis durch Coliforme besteht vor allem in der Zwischenmelkzeit (BRAMLEY et al. 1981, DVG 2012) und steigt bei Kontamination der Euteroberfläche oder von Zitzenverletzungen durch verschmutzte oder falsche Einstreu sowie fehlende Reinigung und Desinfektion (BLOWEY u. EDMONDSON 2010). Auch das Platzangebot im Stall und in den Liegeboxen ist von entscheidender Bedeutung. Weiterhin wird eine Vermehrung der Keime durch Feuchtigkeit und warmes Klima gefördert, somit steigt die Mastitisinzidenz in den Sommermonaten (SMITH et al. 1985, GEORGE et al. 2008). In noch größerem Umfang wirken diese Faktoren während der Trockenstehperiode, die als eine verlängerte Zwischenmelkzeit angesehen werden kann (DVG 2012).

Im Zeitraum bis drei Wochen nach dem Trockenstellen, in dem die Involution der Milchdrüse passiert, und ab etwa zwei Wochen vor der Geburt, in der Kolostralbildungsphase, sind die Neuinfektionsraten mit Umweltkeimen wie den Coliformen besonders hoch (OLIVER u. SORDILLO 1988, BURVENICH et al. 2007), da nicht nur die allgemeine Hygiene, sondern auch der labile Stoffwechselstatus und die schwierige Abwehrsituation der Kuh in der Transitperiode eine entscheidende Rolle bei der Übertragung spielen (GEORGE et al. 2008, DVG 2012). Nach SMITH et al. (1985) sind 40 % der klinischen Mastitisfälle durch coliforme Keime, die in den

ersten zwei Monaten der Laktation auftreten, auf eine subklinische Infektion während der Trockenstehzeit zurückzuführen. Eine Übertragung kann auch erst zu Beginn der Laktation stattfinden, wobei das Risiko zur Abkalbung am größten ist und dann jeden Tag abnimmt (HOGAN u. SMITH 2003). GEORGE et al. (2008) sehen die ersten 30 Tage der Laktation als besonders kritisch an, da prädisponierende Stoffwechselentgleisungen wie Hypokalzämie und Ketose sowie Puerperalstörungen in diesem Zeitraum auftreten. Endometritiden können genauso wie gastrointestinale Störungen Septikämien mit systemischen Endotoxinschüben verursachen, welche eine Euterinfektion durch coliforme Keime begünstigen (BERGMANN 1994, HOEDEMAEKER et al. 2007).

Der Schweregrad der klinischen Ausprägung einer Colimastitis variiert stark (BURVENICH et al. 2003, 2007), da es sich um eine multifaktorielle Infektion handelt. Es können schwerwiegende toxische Erkrankungen auftreten, die mit Allgemeinstörungen durch Entzündungsmediatoren einhergehen und nicht selten zum Verenden des Tieres führen können. SMITH et al. (1985) gehen von etwa 10 % der Fälle mit Coliinfektion mit systemischer Auswirkung aus, wobei von allen perakut verlaufenden Euterentzündungen 60 bis 70 % auf Colikeime zurückzuführen sind. BLEUL et al. (2006) wiesen jedoch nur bei 26 von 61 Eutervierteln mit toxischer Mastitis *E. coli* nach, was der Angabe widerspricht. Die Ansteckung mit Coliformen kann auch klinisch mild verlaufende Mastitiden mit einzig allein Entzündungssymptomen am Euter verursachen, welche meist von kurzer Dauer sind (SMITH et al. 1985), da das Immunsystem den Erreger in den meisten Fällen eliminieren kann (HILL et al. 1978). Aber auch latente Infektionen werden für möglich gehalten (HOGAN et al. 1989^A).

Escherichia (E.) coli

Allgemeine Eigenschaften

Escherichia coli ist ein Gram-negatives, gerades Stäbchenbakterium, welches in der Regel zum Teil peritrich begeißelt und motil ist und in einer Vielzahl von Serovaren auftritt. Es werden zur autochthonen Darmflora gehörende von pathogenen *E. coli* abgegrenzt. Die Pathovare unterscheiden sich von den Kommensalen durch die Ausstattung mit Virulenzgenen über den horizontalen Gentransfer. Die hohe Variabilität dieses Keimes ist Ausdruck seiner hohen Anpassungsfähigkeit an verschiedene Habitate, wobei der Säugetierdarm bei den meisten Tierarten das

Reservoir darstellt und eine stetige Ausscheidung über den Kot stattfindet (GYLES u. FAIRBROTHER 2010, WIELER et al. 2011). Die Zellwand dieser Bakterien besteht aus einer dünnen Peptidoglykanschicht (Murein) und einer äußeren Membran, die ein inneres Blatt aus Phospholipiden und ein äußeres aus Lipopolysacchariden (LPS) besitzt. Das innere Blatt ist mit der Mureinschicht durch ein Lipoprotein verbunden. Das LPS besteht aus dem Lipid-A, dem Kernpolysaccharid und der O-spezifischen Seitenkette aus Hexosen, auch O-Antigen genannt. *Escherichia coli* besitzt meist Flagellen bzw. Geißeln, welche dünne Zellanhängsel aus Proteinen zur Fortbewegung darstellen. Diese H-Antigene haben bei bestimmten Bakterien spezifische Anteile bei relativ konstanter Grundstruktur (VALENTIN-WEIGAND 2011^A). Für eine Unterscheidung der Subtypen werden Serotypisierungen anhand von O- und H-Antigenen der Zellwand vorgenommen. Derzeit sind insgesamt 174 O-Antigene und 53 H-Antigene bekannt (GYLES u. FAIRBROTHER 2010).

E. coli mit einem vollständigen O-Antigen werden als *smooth*-Formen bezeichnet. Im Gegensatz dazu wachsen zeitweise *rough mutants* von *E. coli*, die durch einen Gendefekt nur über einen Teil des LPS-Moleküls verfügen (EBERHART et al. 1979). Seit der Mitte des vergangenen Jahrhunderts ist bekannt, dass *E. coli* in einer kleinen Kolonievariante (*small colony variant*, SCV) wachsen kann. Sie entstehen bei ungünstigen Wachstumsbedingungen und haben eine geringere metabolische Aktivität (COLWELL 1946). Die meisten kleinen Varianten wurden nach Behandlung der Umgebung mit Antibiotika oder toxischen organischen Salzen gefunden oder im Falle der Überalterung der Kultur (CLOWES u. ROWLEY 1955). SCV können besser in Zellen persistieren als die Ursprungskeime und sind dem Immunsystem oder einer Antibiotikatherapie schwerer zugänglich (PROCTOR et al. 2006). Die Wildtypen werden im Vergleich dazu auch *large colony variants* (LCV) genannt.

Euterpathogene *E. coli*

Escherichia coli ist ein wichtiger pathogener Keim im Mastitisgeschehen (BRADLEY 2002). Klinische Ausprägungen dieser Erkrankung reichen von perakut und akut über wiederkehrend und subklinisch (HILL 1994). Die Inzidenz seiner Beteiligung an Mastitiden wird weltweit unterschiedlich angegeben (siehe Tab. 4) und zeigte mit Verdrängung der kontagiösen Erreger in den letzten Jahrzehnten einen tendenziellen Anstieg zugunsten der umwelt-assoziierten Keime (BOOTH 1997, GREEN u. BRADLEY 2002, RUEGG 2012). KAIPANEN et al. (2002), WENZ et al. (2006) und zuletzt SUOJALA et al. (2011) konnten darstellen, dass die Mehrheit der bei einer

Mastitis nachgewiesenen *E. coli* opportunistische, der Umwelt entstammende Erreger sind und keine spezifischen Virulenzfaktoren ausbilden. SHPIGEL et al. (2008) postulieren dennoch ein Vorhandensein eines MPEC (*mammary pathogenic E. coli*). Bei der Serotypisierung von WENZ et al. (2006) konnte weiterhin kein Zusammenhang zwischen Stamm und Schweregrad des Auftretens der klinischen Mastitis gefunden werden. Auch die Untersuchungen von LEHTOLAINEN et al. (2003) und SUOJALA et al. (2011) bestätigen diese Aussage. Die Ausprägung der Symptomatik ist eher abhängig von Faktoren, die von der Kuh selbst ausgehen (BURVENICH et al. 2003).

Die Pathogenität der Erreger beruht nicht auf spezifischen Virulenzfaktoren, sondern auf molekularen Bausteinen, welche vom Immunsystem erkannt werden (SHPIGEL et al. 2008). Berücksichtigung sollte hier das von den Bakterien freigesetzte Lipopolysaccharid finden, welches auch als Endotoxin bekannt ist. LPS kann im Euter direkt entstehen oder bei Stress und Futterumstellungen aus dem Darmtrakt translozieren (PLAIZIER et al. 2012). Freies Endotoxin fördert dabei die Übertritte von Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in die systemische Zirkulation (FRITSCH 1998). Seine Wirkung als potenter Stimulator des Immunsystems ist dosisabhängig (WENZ et al. 2006). Wird das LPS in großen Mengen frei, kann es zur Endotoxämie bis hin zur Schocksymptomatik kommen (ANDERSEN 2003), wobei die systemische Reaktion des Organismus durch die Zytokinproduktion der Makrophagen veranlasst wird (HOEBEN et al. 2000). Demzufolge kommt, neben der Immunantwort, der Anzahl an vorhandenen Bakterien und deren Wachstum eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese einer Colimastitis zu (HOGAN u. SMITH 2003). Beispielsweise wird die Detoxifikation des LPS durch die Acyloxyacyl-Hydrolase-Aktivität der neutrophilen Granulozyten versucht (MC DERMOTT et al. 1991), welche jedoch im Abkalbezeitraum reduziert ist (DOSOGNE et al. 1998). Effiziente LPS-Detoxifizierungen werden auch durch Alkalische Phosphatasen durchgeführt, woran Kolostralmilch sehr reichhaltig ist (KOYAMA et al. 2002). Zudem können spezifische Antikörper, die direkt gegen Zellwandbestandteile gerichtet sind, hilfreich sein das LPS in Menge und Wirkung zu reduzieren (DOSOGNE et al. 2002). Neben klinischen Mastitiden werden auch latente, inapparente Infektionen für möglich gehalten (HOGAN et al. 1989^A). LIPMAN et al. (1994) bewiesen, dass meist die gleichen *E. coli*-Stämme bei Wiederauftreten einer klinischen Mastitis nachweisbar sind. Da laut NEMETH et al. (1994) im Kot und in der Umwelt eine Vielzahl

von Stämmen zu finden sind, ist eine Neuinfektion mit exakt dem gleichen Stamm sehr unwahrscheinlich. BRADLEY u. GREEN (2001^A) wiederholten diese Untersuchungen mit zusätzlichem DNA-Fingerprinting der Erreger und konnten die Aussagen bestätigen. Die Häufigkeit des Auftretens einer latenten Infektion durch *E. coli* wird mit knapp 5 % (DÖPFER et al. 1999) bis zu etwa 20 % unterschiedlich angegeben, die wiederkehrenden Erkrankungen verlaufen mild (BRADLEY u. GREEN 2001^A). Letztere Autoren vermuteten einen Wandel der Eigenschaften von *E. coli*, um besser an die Milchdrüse adaptiert zu sein. DÖPFER et al. (2000) und DOGAN et al. (2006) konnten belegen, dass nun mehr zellinvasive Fähigkeiten der an Colimastitis beteiligten Erreger vorhanden sind und diese intrazellulär überleben können. ALMEIDA et al. (2011) begründeten dies mit der Fähigkeit der betroffenen Stämme die bakteriziden Mechanismen der Zellen, wie die Fusion von Endosom und Lysosom, zu umgehen.

Tab. 4: Auftreten von *E. coli* bei klinischer und subklinischer (subklin.) Mastitis (M.)

Klinische M.	Coliforme	31,8 %	USA	SMITH et al. (1985)
	Coliforme	29,7 %	USA	HOGAN et al. (1989 ^A)
	Coliforme	37 %	USA	GONZALES et al. (1990)
	<i>E. coli</i>	12,2 %	Kanada	SARGEANT et al. (1998)
	<i>E. coli</i>	17,6 %	Kanada	OLDE RIEKERINK et al. (2008)
	<i>E. coli</i>	34,7 %	UK	BRADLEY u. GREEN (2001 ^B)
	<i>E. coli</i>	19,8 %	UK	BRADLEY et al. (2007)
	<i>E. coli</i>	17,3 %	UK	ANON. ^B (2011)
	<i>E. coli</i>	12,5 %	Uruguay	GIANNEECHINI et al. (2002)
	<i>E. coli</i>	14,4 bis 16,5 %	Estland	KALMUS et al. (2011)
	<i>E. coli</i>	15,9 %	Schweden	ERICSSON UNNERSTAD et al. (2009)
	<i>E. coli</i>	16 %	Frankreich	BOTREL et al. (2010)
	Coliforme	9 bis 12,7 %	Schweiz	SCHÄLLIBAUM (1996)
	Coliforme	12 %	Deutschland	ANON. ^A (2011)
Subklin. M.	<i>E. coli</i>	4,9 %	UK	BRADLEY et al. (2007)
	<i>E. coli</i>	11,3 %	UK	ANON. ^B (2011)
	<i>E. coli</i>	1,5 %	Uruguay	GIANNEECHINI et al. (2002)
	<i>E. coli</i>	1,6 bis 3,8 %	Estland	KALMUS et al. (2011)
	<i>E. coli</i>	2,9 %	Schweden	PERSSON et al. (2011)
	<i>E. coli</i>	0 bis 1 %	Schweiz	ROESCH et al. (2007)
	<i>E. coli</i>	1,6 %	Frankreich	BOTREL et al. (2010)
	<i>E. coli</i>	0,4 %	USA	WILSON et al. (1997)
	Coliforme	0,8 %	Belgien	PIEPERS et al. (2007)
	Coliforme	0,14 %	Finnland	PITKÄLÄ et al. (2004)
	Coliforme	0,3 %	Norwegen	ØSTERÅS et al. (2009)
	Coliforme	3,3 %	Deutschland	SOBJIRAJ et al. (1997)
	Coliforme	0,3 %	Deutschland	TENHAGEN et al. (2006)
	<i>E. coli</i>	1,2 %	Deutschland	KIRST et al. (2009)

2.2.2.2 Streptokokken

Streptokokken sind kugelförmige oder ovoide Gram-positive Bakterien, die meist in Ketten gelagert sind. Sie sind fakultative Anaerobier und werden über den Nachweis des Zellwandpolysaccharids, der sogenannten C-Substanz, differenziert. Dabei werden die Streptokokken in Serogruppen nach Lancefield eingeteilt. Als Virulenzfaktoren sind eine Vielzahl von Oberflächenproteinen bekannt, die die Adhäsion und Invasion der Erreger ermöglichen und Schutz vor Phagozytose bieten. Weiterhin werden Hämolsine und Enzyme freigesetzt. Ihr Habitat sind vorrangig Haut und Schleimhaut von Mensch und Tier (VALENTIN-WEIGAND 2011^B).

Streptococcus (Sc.) uberis

Streptococcus uberis ist keiner Lancefield-Gruppe zuzuordnen (TIMONEY 2010, VALENTIN-WEIGAND 2011^B). Trotz seines Namens kommt *Sc. uberis* auch außerhalb des Euters vor. Auf Tonsillen, Schleimhäuten und Epithelien sowie im Darm von Rindern ist dieser Erreger als Kommensale nachweisbar (TIMONEY 2010). Zudem kann er lange Zeit in der Umwelt überleben (JAIN 1979) und wird deshalb zu den umwelt-assoziierten Mastitiserregern gezählt (BRADLEY 2002). Die große Vielzahl an Reservoirs stellt eine stete Infektionsgefährdung dar (LEIGH 1999), sowohl in der Laktation, als auch in der Trockensteherperiode (TODHUNTER et al. 1995). Nach TIMONEY (2010) entscheiden die Virulenz des Stammes, die Anzahl der Erreger, die Jahreszeit, die Parität und der Immunstatus der Kuh über den Schweregrad der Eutererkrankung. Neben klinischen Mastitiden kann *Sc. uberis* auch chronische und subklinische Infektionen verursachen, die nur schwer therapierbar sind und sich wie bei den kuh-assoziierten Erregern in der Herde ausbreiten können (BLOWEY u. EDMONDSON 2010).

Aktuelle Untersuchungsergebnisse einer deutschen Studie belegen, dass es sich bei *Sc. uberis* mit 23 % aller klinischen Fälle um den am häufigsten nachgewiesenen Mastitiserreger handelt (ANON^A 2011). Ähnliche Inzidenzen konnten in Frankreich (22,1 %; BOTREL et al. 2010), Großbritannien (23,7 %; ANON^B 2011) und Estland (16,1 bis 21,8 %; KALMUS et al. 2011) festgestellt werden. Bei subklinischen Mastitiden wurde *Sc. uberis* in Deutschland zu 8,2 % nachgewiesen (SOBIRAJ et al. 1997). TENHAGEN et al. (2006) analysierten 2.560 Milchproben von klinisch unauffälligen Tieren aus 80 Betrieben in Brandenburg, bei denen die Prävalenz eines *Sc. uberis*-Nachweises bei nur 1 % aller aufgefundenen Erreger lag. Dies entspricht nicht den von KIRST et al. (2009) durchgeführten Untersuchungen, bei welchen

Sc. uberis in 14,8 % der kontaminierten Proben aus Beständen in Sachsen-Anhalt nachweisbar war. In Großbritannien konnte dieser Keim jedoch sogar in 21,7 % aller subklinischen Fälle angezüchtet werden (ANON^B 2011).

Streptococcus (Sc.) agalactiae

Streptococcus agalactiae, welcher zur Lancefield-Gruppe B gehört, ist ein kontagiöser, an das Rindereuter angepasster Mastitiserreger (VALENTIN-WEIGAND 2011^B). Als obligat euterpathogener Keim kann er nicht in der Umwelt überleben (JAIN 1979). Die Infektion erfolgt galaktogen-aszendierend beim Melken. In den meisten Fällen verläuft die Erkrankung chronisch-katarrhalisch, akute Prozesse des sogenannten Gelben Galts haben exsudativ-eitrigen Charakter. Bei allen Verlaufsformen, einschließlich der subklinischen, kommt es zum drastischen Milchrückgang. Unbehandelte Galtfälle können zur Atrophie des Euterviertels führen (VALENTIN-WEIGAND 2011^B). Der Nachweis von *Sc. agalactiae* in einer Herde wird als Indikator für fehlende Melkhygiene angesehen (BLOWEY u. EDMONDSON 2010).

Durch Optimierung des Melkmanagements konnte die Prävalenz des Auftretens von *Sc. agalactiae* in den letzten Jahrzehnten stark minimiert werden (RUEGG 2012). In einer aktuellen deutschen Studie verursachte der Erreger unter 1 % aller klinischen Mastitiden (ANON^A 2011). Die gleichen Ergebnisse brachten Untersuchungen in Großbritannien (BRADLEY et al. 2007, ANON^B 2011), den USA (GONZALES et al. 1990), Kanada (SARGEANT et al. 1998, OLDE RIEKERINK et al. 2008), Frankreich (BOTREL et al. 2010) und Schweden (ERICSSON UNNERSTAD et al. 2009). Auch bei subklinischen Erkrankungen konnte *Sc. agalactiae* in Brandenburg nur noch zu 0,7 % nachgewiesen werden (TENHAGEN et al. 2006), in Sachsen-Anhalt dagegen gar nicht mehr (KIRST et al. 2009). Einige Jahre zuvor hatten SOBIRAJ et al. (1997) noch eine Inzidenz von 4,9 % festgestellt. Jedoch gibt es einen Trend der erneuten Zunahme in Prävalenz und Inzidenz, da Betriebe aus wirtschaftlichen Gründen Zukäufe tätigen müssen (MWEU et al. 2012).

Streptococcus (Sc.) dysgalactiae

Streptokokken mit dem Speziesnamen *dysgalactiae* sind in die Lancefield-Gruppen A, C, G und L einzuordnen, wobei Stämme der Subspezies (ssp.) *dysgalactiae*, welche als Erreger von akuten und subklinischen Mastitiden beim Rind auftreten, zur Serogruppe C gehören (TIMONEY 2010). Da *Sc. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*

auch in der Umwelt überleben kann, wird die Einordnung zu den kontagiösen Mastitisserregern als kritisch angesehen. RUEGG (2012) zählt diesen Keim aktuell zu den umwelt-assoziierten Streptokokken wie auch *Sc. uberis*. Die Infektion der Milchdrüse erfolgt vor allem über Läsionen der Zitzen- und Euterhaut und vermutlich über das Belecken der Zitzen, da *Sc. dysgalactiae ssp. dysgalactiae* auch auf den Tonsillen von Rindern gefunden wurde (BLOWEY u. EDMONDSON 2010). Seine Fähigkeiten der Adhärenz und Invasion von Epithelzellen ermöglichen eine intrazelluläre Persistenz ohne Vitalitätsverlust (CALVINHO u. OLIVER 1998). Latente Infektionen spielen eine eher untergeordnete Rolle (BLOWEY u. EDMONDSON 2010), zur Übertragung beim Melkvorgang kann es außerdem kommen (DVG 2012). In Deutschland werden derzeit 8 % aller klinischen Mastitiden durch *Sc. dysgalactiae ssp. dysgalactiae* verursacht (ANON^A 2011). Ähnliche prozentuale Anteile am akuten Euterentzündungsgeschehen liegen in Großbritannien (ANON^B 2011), Frankreich (BOTREL et al. 2010), Estland (KALMUS et al. 2011) und Kanada (OLDE RIEKERINK et al. 2008) vor. Im Bereich der subklinischen Erscheinungsform ermittelten SOBIRAJ et al. (1997) deutschlandweit eine Inzidenz von 8,1 %, in Sachsen-Anhalt ergaben sich einige Jahre später dagegen nur 1,5 % bei Untersuchungen von KIRST et al. (2009).

2.2.2.3 Enterokokken

Diese im Darm von Säugetieren vorkommenden Bakterien wurden lange zu den Streptokokken gezählt, wurden aber als eigene Gattung abgetrennt. Bei Nachweis im Rahmen eines Mastitisgeschehens handelt es sich um eine sporadische, faktorenbeflussende Infektion durch *Enterococcus (Ec.) faecalis*, *Ec. faecium* oder *Ec. durans* als Umweltkeime. Bei diesen Erregern sind starke Antibiotikaresistenzen zu beobachten (VALENTIN-WEIGAND 2011^B).

2.2.2.4 Staphylokokken

Staphylokokken sind fakultativ anaerobe, Katalase-positive, kugelförmige, Gram-positive Bakterien, die sich teilweise charakteristisch in Haufen anordnen. Primär besiedeln sie Haut und Schleimhäute, sind jedoch auch als Verursacher lokaler und systemischer eitriger Entzündungen bei Mensch und Tier bekannt. Durch die Produktion einer Vielzahl von Virulenzfaktoren schützen sie sich vor Phagozytose und antikörpervermittelten Abwehrmechanismen, einige Stämme sind zusätzlich Toxinbildner (VALENTIN-WEIGAND 2011^B).

Auf der Grundlage der Koagulase-Reaktion werden positive Spezies wie *Staphylococcus (S.) aureus* von negativen (KNS) unterschieden (HERMANS et al 2010).

S. aureus

Staphylococcus aureus hat weltweit eine große Bedeutung als kuh-assoziiertes, kontagiöser Mastitisserreger. Die Infektion geschieht auf dem galaktogen-anziehenden Weg (HERMANS et al. 2010), die Reservoirs der Keime sind die vorgeschädigte Euter- und Zitzenhaut sowie das Eutersekret infizierter Tiere, so dass eine Übertragung während des Melkvorganges stattfindet. Die Erkrankungen verlaufen zum großen Teil subklinisch und chronisch. Aber auch akute und seltenere perakute Formen mit Gangränbildung werden beobachtet (JAIN 1979), wofür eine starke Toxinbildung bei Immunsuppression verantwortlich ist (BLOWEY u. EDMONDSON 2010). BLEUL et al. (2006) fanden den Erreger bei 11 von 61 Euterquarteln mit toxischer Mastitis.

Meist entstehen chronische Entzündungen aufgrund der geringen Selbstheilungsrate, es kommt es zu Parenchymschäden mit Fibrosen und Abszessbildung und dauerhaft verminderter Milchleistung (GEORGE et al. 2008). DJABRI et al. (2002) ermittelten außerdem einen durchschnittlich fünffachen Anstieg der somatischen Zellzahl in der Milch infizierter Viertel.

Die Prävalenz von *S. aureus* in Milchviehherden konnte in den letzten Jahren reduziert werden (RUEGG 2012). Sie wird von TENHAGEN et al. (2006) in brandenburgischen Herden mit 5,7 % angegeben, in Sachsen-Anhalt mit 9,7 % (KIRST et al. 2009), in Hessen mit 5 % (SCHWARZ et al. 2010).

Als deutschlandweiten Hauptverursacher von subklinischen Mastitiden konnten SOBIRAJ et al. (1997) *S. aureus* mit einer Inzidenz von 35,3 % aufführen. In anderen Ländern liegen mit 16,6 bis 62,8 % ähnliche Untersuchungsergebnisse vor (SCHÄLLIBAUM 1996, GIANNEECHINI et al. 2002, BOTREL et al. 2010, KALMUS et al. 2011, ANON^B 2011, PERSSON et al. 2011). Bei klinischen Mastitiden konnte *S. aureus* mit 14 % in Deutschland weitaus seltener nachgewiesen werden (ANON^A 2011). Auch dies deckt sich mit den im Bereich von 11,7 bis 37,5 % angegebenen Inzidenzen in anderen Ländern (SCHÄLLIBAUM 1996, GIANNEECHINI et al. 2002, OLDE RIEKERINK et al. 2008, BOTREL et al. 2010, ANON^B 2011, KALMUS et al. 2011).

Koagulase-negative Staphylokokken (KNS)

Die minorpathogenen koagulase-negativen Staphylokokken als physiologische Haut- und Schleimhautbesiedler hemmen einerseits kompetitiv das Wachstum von Majorpathogenen (LAM et al. 1997), werden jedoch auch als primär euterpathogen angesehen (TAPONEN u. PYÖRÄLÄ 2009, HERMANS et al. 2010). Die Prävalenz ist bei primiparen Tieren höher als bei multiparen (PYÖRÄLÄ u. TAPONEN 2009). Für die Begünstigung einer Infektion sind schlechte Melkhygiene und eine schlechte Zitzenkondition der Tiere zu nennen. Folge ist vorrangig eine subklinische Mastitis mit verminderter Milchleistung und erhöhter somatischer Zellzahl (GEORGE et al. 2008), jedoch weniger erhöht als bei *S. aureus*-Infektionen (DJABRI et al. 2002). Seltene klinische Fälle haben einen milden Verlauf (TAPONEN et al. 2006). Die Selbstheilungsrate der Mastitiden wird als hoch angesehen, weshalb diese in vielen Ländern unbehandelt bleiben. Eine Persistenz der Infektion kann auftreten (TAPONEN u. PYÖRÄLÄ 2009), da eine Adhärenz und Penetration der Epithelzellen möglich ist (ALMEIDA u. OLIVER 2001). Bei den Spezies, welche im Zusammenhang mit Euterentzündungen des Rindes beschrieben worden, handelt es sich um *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. carnosus*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. cohnii*, *S. capitis*, *S. hyicus* und *S. caprae* (HERMANS et al. 2010), wobei *S. simulans* (JARP 1991) und *S. chromogenes* (TAPONEN u. PYÖRÄLÄ 2009) die häufigsten Keime sind. In der Mastitisdiagnostik wird jedoch meist nicht die Spezies bestimmt, KNS werden hier als einheitliche Gruppe behandelt (PYÖRÄLÄ u. TAPONEN 2009).

Die Prävalenz von KNS in Brandenburg wurde von TENHAGEN et al. (2006) mit 9,1 % angegeben, hier waren die Erreger die am häufigsten gefundenen. KIRST et al. (2009) konnten in 25 % ihrer 12.899 in Sachsen-Anhalt untersuchten Anfangsgemelke Mastitisserreger nachweisen. KNS waren davon 40,4 %, was die Autoren im Vergleich mit anderen Bundesländern als sehr hoch ansehen. Die Prävalenz in Hessen liegt in 615.187 untersuchten Proben bei 17,17 % (SCHWARZ et al. 2010). Der Nachweis von KNS bei subklinischen Mastitiden in Deutschland gelang SOBIRAJ et al. (1997) in 18,5 % der Fälle. Auch im Ausland scheinen die KNS-Anteile zu dominieren, sie liegen bei 5,7 bis 24,2 % (SCHÄLLIBAUM 1996, WILSON et al. 1997, GIANNEECHINI et al. 2002, PITKÄLA et al. 2004, BRADLEY et al. 2007, SAMPIMON et al. 2009, BOTREL et al. 2010, ANON^B 2011, PERSSON et al. 2011, KALMUS et al. 2011).

In einer deutschen Studie zur Erregerverteilung bei klinischen Euterentzündungen sind KNS mit 9 % von untergeordneter Bedeutung (ANON^A 2011). In anderen Ländern konnten ähnliche Inzidenzraten (von 6,2 bis 11 %) ermittelt werden (GIANNECHINI et al. 2002, OLDE RIEKERINK et al. 2008, ERICSSON UNNERSTAD et al. 2009, BOTREL et al. 2010, KALMUS et al. 2011). Nur in Großbritannien scheinen KNS bei klinischer Mastitis mit 1,6 % nahezu bedeutungslos zu sein (ANON^B 2011).

2.2.3 Mastitisiagnostik

Die Eutergesundheit spielt eine entscheidende Rolle in der Milchproduktion, da nur gesunde Euter qualitativ hochwertige Milch geben. Klinische als auch subklinische Mastitiden haben einen Effekt auf Milchleistung, -zusammensetzung und die Verarbeitungseigenschaften. Umso wichtiger ist eine schnelle Erkennung einer Eutererkrankung. Bei einer klinischen Mastitis liegen makroskopische Veränderungen vor, sie ist somit leicht zu diagnostizieren. Aber auch subklinische Erkrankungen sollten schnellstmöglich erkannt werden (PYÖRÄLÄ 2003). Die Grundlage der Diagnostik bildet eine Kombination aus Erregernachweis und Entzündungsnachweis für die sekretorische Einheit Euterviertel (DVG 2012).

2.2.3.1 Somatische Zellzahl (Somatic Cell Count, SCC)

Der Zellgehalt in der Milch gilt als wichtiger Indikator für den Eutergesundheitsstatus (SCHUKKEN et al. 2003, HOEDEMAKER et al. 2007, WINTER 2009), seine Messung gilt in Kombination mit dem Erregernachweis als Goldstandard zur Diagnostik von Mastitiden (PYÖRÄLÄ 2003).

Den größten Anteil der somatischen Zellen in der Milch machen die Abwehrzellen aus, deren Anzahl und Differenzierung verschiedenen Einflussgrößen unterliegt. In nicht infizierten Eutervierteln gehören etwa 80 % der Zellen zu dieser Gruppe, in der Milch des infizierten Euters jedoch bis zu 99 % (SORDILLO et al. 1997). Den kleineren Teil der somatischen Zellen nehmen Zellen ohne Abwehrfunktion ein. Hierbei handelt es sich um Zelltrümmer und nicht exakt differenzierbare Zellen, welche mit etwa 14 - 54 % der Gesamtzellzahl beschrieben werden. Epithelzellen, die nur mittels eines Markers detektiert werden können, überschreiten einen Anteil von 2 % nicht (MIELKE 1994, BURVENICH et al. 2009^B).

Nach Angaben der DVG (2012) wird ein zytologischer Grenzwert von bis zu 100.000 Zellen/ml als physiologisch erachtet. HOEDEMAKER et al. (2007) beschreiben den

Zellgehalt von Milch gesunder Euterviertel in der ersten Laktation jedoch mit nur 10.000 bis 30.000 Zellen/ml. Ein Anstieg der somatischen Zellzahl ist meist ein Hinweis auf ein Entzündungsgeschehen im Euter, da es durch dieses zu einer starken Einwanderung von Leukozyten kommt (DOHOO u. MEEK 1982, HARMON 1994). Berücksichtigung sollte jedoch finden, dass auch andere Faktoren einen Einfluss auf die Gesamtzellzahl der Milch haben können, wobei es allerdings zu einer gleichmäßigen Erhöhung auf allen Eutervierteln kommt.

Zu nennen sind Stress durch Umstallung, Futterumstellung und Hitze sowie auch die Anzahl der Laktationen, da sich mit fortschreitendem Alter der Kuh die Menge an ausgeschiedenen Zellen erhöht. Entscheidend für die Bewertung der Höhe der SCC ist das Laktationsstadium der Milchkuh. Es sollte bedacht werden, dass bis zu zwei Wochen nach der Abkalbung und auch am Ende der Laktation physiologisch eine erhöhte Zellzahl vorliegen kann (DOHOO u. MEEK 1982). BARKEMA et al. (1999) konnten nachweisen, dass die erhöhte Zellzahl des Kolostrums bereits innerhalb von drei Tagen nach der Geburt wieder absinkt, falls es sich um ein gesundes Euterviertel handelt. Einen weiteren Einfluss auf die Höhe der somatischen Zellzahl hat die infizierende Erregerspezies, wobei Minorpathogene einen geringeren Anstieg als Majorpathogene verursachen (DJABRI et al. 2002). Nicht-infektiöse idiopathische Faktoren stellen zu kurze oder zu lange Melkintervalle und fehlerhafte Melktechnik dar (HOEDEMAKER et al. 2007, WINTER 2009).

Die Messung der somatischen Zellzahl in der Milch kann direkt oder indirekt erfolgen. Weit verbreitet in der Praxis ist die indirekte Untersuchungsmethode nach dem Prinzip des California-Mastitis-Testes (CMT), auch bezeichnet als Schalm-Test. Dieser kann unmittelbar an der Kuh als Schalentest durchgeführt werden (PYÖRÄLÄ 2003). Die Milch aus den Eutervierteln wird in den vier Schalen zu je gleichen Teilen mit anionischem Detergenz vermischt. Die in der Flüssigkeit enthaltenen Tenside zerstören die Zellkerne der somatischen Zellen und setzen deren DNS frei. Diese verbindet sich mit der Reagenzlösung zu einem Kolloidkomplex, der zu einer Konsistenzänderung führt. Je nach Höhe des Zellgehaltes treten somit Gelschlieren oder Gelklumpen in der Testschale auf (SCHALM u. NOORLÄNDER 1957). Die Konsistenzveränderung wird negativ oder aber einfach, zweifach oder dreifach positiv bewertet. In der Früh-laktation (SARGEANT et al. 2001) sowie vor dem Trockenstellen (BHUTTO et al. 2012) gilt der CMT als verlässliches Hilfsmittel bei der Früherkennung von Eutererkrankungen.

Eine direkte Zellzählung erfolgt heutzutage automatisiert durch die weltweit anerkannte Methode des Fossomatic®-Systems (IDF 1981), das mittels eines fluoreszenz-elektronenoptischen Verfahrens arbeitet. Die Zellkerne der mit Borsäure versetzten Milchprobe werden dazu mit fluoreszierendem Ethidiumbromid angefärbt. Dann erfolgt die Messung der von den Zellkernen ausgehenden Impulse im kontinuierlichen Milchfluss durch ein Mikroskop (HAASMANN und SCHULZ 1994).

2.2.3.2 Akut-Phase-Proteine

In den vergangenen Jahren fokussierte das wissenschaftliche Interesse auf der potentiellen Nutzung von Akut-Phase-Proteinen als Mastitisindikator (ECKERSALL et al. 2001, MURATA et al. 2004). Laut CECILIANI et al. (2012) liegt hier die bedeutendste Indikation für die Messung von APP beim Rind, da damit auch subklinische Erkrankungen erkannt werden können. Der Anstieg der Serumkonzentration ist bei akuten Entzündungen jedoch signifikant höher als bei chronischen (HORADAGODA et al. 1999). *Major* APP, die normalerweise in niedrigen Konzentrationen vorkommen sowie starke und schnelle Konzentrationsanstiege zeigen, sind besonders nützlich in der Diagnostik (SALONEN et al. 1996).

Haptoglobin

Erhöhte Serumkonzentrationen an Haptoglobin wurden beim Rind im Verlauf von verschiedenen traumatischen und entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen. Hierzu gehört auch die bovine Mastitis (CONNER u. ECKERSALL 1986, SALONEN et al. 1996, ECKERSALL et al. 2001, NIELSEN et al. 2004, ECKERSALL et al. 2006). Der etwa 100-fache Anstieg unterliegt jedoch diversen Einflussfaktoren. So kann die Menge an freiem Haptoglobin beispielsweise stark sinken, wenn im Falle einer Hämolyse vermehrt Hämoglobin frei wird und Komplexe gebildet werden (PETERSEN et al. 2004). Eine Auftrennung als Vorbereitung auf die quantitative Bestimmung ist möglich (SALONEN et al. 1996).

ECKERSALL et al. (2001) konnten erstmals auch in der Milch von euterkranken Tieren erhöhte Haptoglobinkonzentrationen nachweisen. Neben der Synthese durch Hepatozyten ist von einer zusätzlichen lokalen Expression von Haptoglobin bei einer Mastitis auszugehen (HISS et al. 2004, ECKERSALL et al. 2006, THIELEN et al. 2007, LAI et al. 2009). Der Nachweis in Milch erscheint somit sinnvoll für die Mastitisiagnostik, da eine Erhöhung der Haptoglobinkonzentration eindeutig einer Eutererkrankung zugeordnet werden muss (NIELSEN et al. 2004).

C-reaktives Protein

Da das C-reaktive Protein beim Rind nicht als ein Akut-Phase-Protein angesehen wird (ECKERSALL u. CONNER 1988), hat es scheinbar wenig Potenzial in der Mastitisdagnostik (PYÖRÄLÄ 2003), obwohl LEE et al. (2003) eine positive Korrelation zwischen erhöhten CRP- Werten im Serum und Erkrankungen von Kühen erkannten. Veränderungen des CRP-Spiegels in der Milch bei subklinischen Eutererkrankungen oder als Reaktion auf Vakzination oder Medikation sind denkbar (KRÜGER et al. 1995). SCHRÖDL et al. (1995) konnten erstmals einen signifikanten Anstieg des CRP-Gehaltes in der Milch bei Mastitis nachweisen. Der Mittelwert in Milch gesunder Tiere lag bei 82 ng/ml, bei den euterkranken Tieren bei 1083 ng/ml. In einer anderen Studie von HAMANN et al. (1997) erschien die Unterscheidung von gesunden und subklinisch kranken Eutervierteln anhand der CRP-Konzentrationen aufgrund fehlender Signifikanz wiederum kaum möglich. Zudem haben das Laktationsstadium (NEUMANN u. KRÜGER 1999) als auch die beteiligte Erregerspezies (KRÜGER u. NEUMANN 1999) Einfluss auf gemessene Werte.

2.2.3.3 Elektrische Leitfähigkeit

Eine weitere Möglichkeit des schnellen indirekten Nachweises einer Mastitis am Tier besteht in der Messung der elektrischen Leitfähigkeit der Milch mit speziellen Handgeräten oder mit in Melkgeräten integrierten Messeinheiten (RUEGG u. REINEMANN 2002, PYÖRÄLÄ 2003). Die spezifische elektrische Leitfähigkeit der Milch ergibt sich dabei aus dem Vorhandensein von Elektrolyten, deren Austausch über die Blut-Euter-Schranke reguliert und konstant gehalten wird. Bei Störungen der Permeabilität treten vermehrt Natrium- und Chloridionen aus dem Blut in die Milch über (WENDT et al. 1998). Neben einer Mastitis haben jedoch auch die Temperatur und der Fettanteil der Milch sowie auch Rasse und Laktationsstadium Einfluss auf die elektrische Leitfähigkeit, was den diagnostischen Wert der Messung minimiert (HAMANN u. ZECCONI 1998, RUEGG u. REINEMANN 2002). Laut NIELEN et al. (1992) können klinische Mastitiden detektiert werden, subklinische jedoch nicht. Die Sensitivität bei der Erkennung von inapparenten Infektionen wird mit nur 55 % angegeben (NIELEN et al. 1995).

2.2.3.4 Erregernachweis

Die Identifizierung des ursächlichen Agens ist eine zentrale Aufgabenstellung in der Diagnostik einer Mastitis (WENDT et al. 1998). Standardmethode dafür ist die Kultivierung der Erreger mittels bakteriologischer Untersuchung. Aber auch der Nachweis mittels PCR findet mehr und mehr Anwendung (WINTER 2009).

In der jüngsten Vergangenheit hat ein neuartiger Ansatz zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen die molekulare Diagnostik erweitert. Mittels *matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS) werden Keime anhand ihrer ribosomalen Proteine identifiziert. Gegenüber der herkömmlichen bakteriologischen Untersuchung mittels biochemischer Identifizierung bietet dieses Verfahren Schnelligkeit und sichere Ergebnisse. Innerhalb eines Tages können Erreger von klinischen und subklinischen Mastitiden nachgewiesen werden (BARREIRO et al. 2010). Sogar eine sichere Differenzierung von Staphylokokken-Spezies kann hiermit vorgenommen werden (DUBOIS et al. 2010).

Für jegliche diagnostischen Verfahren ist die Entnahme von Viertelanfangsgemelksproben vorzuziehen und die Einhaltung antiseptischer Bedingungen unerlässlich (DVG 2009). Ein Problem stellt bei herkömmlicher Probenentnahme die Differenzierung einer echten Infektion des Drüsengewebes und einer auf den Strichkanal begrenzten Besiedlung mit Keimen dar (DVG 2012).

2.2.3.5 Endotoxinnachweis

Der Nachweis des von den Gram-negativen Bakterien freigesetzten Endotoxins in der Milch kann bei der Diagnose- und Prognosestellung einer schweren Mastitis hilfreich sein (ANRI 1989), da die Erreger in einigen Fällen nicht nachweisbar sind. Auch hinsichtlich der Therapie gibt es Vorteile. Da akute Mastitiden eine schnelle Behandlung erfordern und Symptome keinen Hinweis auf das ursächliche Agens geben, kann bei LPS-Nachweis ein gegen Gram-negative Bakterien wirksames Antibiotikum verabreicht werden (WAAGE et al. 1994). Diese Autoren verwendeten den Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test, welcher eine Spezifität von 97 % und eine Sensitivität von 63 % beim Nachweis von Gram-negativen Erregern zeigte. Bei perakuten Mastitiden waren die Werte im Eutersekret sogar bis zu fünfmal höher als im Plasma (HAGOKI et al. 1984/85).

2.3 Mastitisbekämpfung

2.3.1 Managementfaktoren

Die Bekämpfungsmaßnahmen haben aufgrund der unterschiedlichen Übertragungswege und Reservoirs bei den kontagiösen und umwelt-assoziierten Erregern verschiedene Schwerpunkte.

Eine wichtige Komponente ist die Eliminierung bereits bestehender Infektionen in Form von Anwendung antimikrobieller Substanzen in der Laktation oder beim Trockenstellen. Ohne die Einhaltung von Hygienemaßnahmen ist der Erfolg einer Therapie jedoch nur von kurzer Dauer (NEAVE et al. 1969, PHILPOT 1979).

Das National Mastitis Council (NMC) veröffentlichte vor fast 50 Jahren einen von NEAVE et al. (1969) entwickelten „Fünf-Punkte-Plan“, um Hilfestellung bei der Reduktion von Keimen im Bestand zu geben. Dieser beinhaltet die Zitzendesinfektion nach dem Melken, das zwingende antibiotische Trockenstellen, die Therapie klinischer Mastitiden, eine fehlerfreie Melktechnik sowie die Merzung chronisch infizierter Tiere als Vorgabe. Für die kontagiösen Mastiserreger wie *S. aureus* sind all diese Maßnahmen von großer Bedeutung (BARKEMA et al. 2006), ihre Anwendung führte zu einer signifikanten Reduktion von durch *S. aureus* oder *Sc. agalactiae* verursachten Euterentzündungen (RUEGG 2012).

Die Bekämpfung fokussiert aufgrund dessen momentan eher auf die umwelt-assoziierten Erreger. Die Strategien sind jedoch deutlich komplexer als bei den kontagiösen Keimen, da Reservoirs nur durch Managementänderungen zu minimieren sind. Dementsprechend änderte das NMC den „Fünf-Punkte-Plan“ und gab neue Hinweise in Form eines „Zehn-Punkte-Planes“ (NMC 2009), der eine saubere und trockene Umwelt voraussetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Verbesserung der Aufstallung mit Minimierung von Feuchtigkeit und Stress (EBERHART et al. 1979) und die Verwendung von anorganischer Einstreu (HOGAN et al. 1989^B) das Infektionsrisiko mit umwelt-assoziierten Erregern senken können. Negative Energiebilanzen durch nicht bedarfsgerechte Fütterung sollten ebenso vermieden werden (PYÖRÄLÄ 2002).

Auch die DVG (2012) plädiert darauf die Ereigniskette „Übertragung – Invasion – Infektion – Entzündung“ zu durchbrechen, in dem einerseits eine Reduktion des Kontaminationsrisikos erfolgt und andererseits die Abwehrmechanismen der Kuh gestärkt werden.

2.3.2 Immunmodulation

Es wird seit vielen Jahren versucht die körpereigene Abwehr zu steigern, um die Inzidenz und Schwere von Mastitiden zu minimieren. Neben der Schaffung von Kuhkomfort und einer Ernährungsoptimierung gibt es Bestrebungen resistente Kühe zu züchten und durch intramammäre Verabreichung von Zytokinen und probiotischen Bakterien die angeborene Immunantwort zu verbessern. Bis heute konnten damit noch keine großen Erfolge verzeichnet werden (PETZL u. SCHUBERTH 2012).

2.3.3 Impfung

Die Impfung als präventive Maßnahme in der Mastitisbekämpfung kann nur in Ergänzung zur Optimierung des Managements betreffend Haltungs- und Melkhygiene vorgenommen werden (ERSKINE 2012).

In den letzten Jahrzehnten wurden Vakzinen gegen diverse Erreger von Mastitiden entwickelt, was sich allerdings deutlich schwieriger darstellte als für andere infektiöse Erkrankungen (PYÖRÄLÄ 2002). Alle Versuche hatten zum Ziel Neuinfektionen und Entzündungen zu verhindern, die Selbstheilung bei subklinischen Erkrankungen zu fördern oder den Schweregrad bei klinischen Mastitiden herabzusetzen (YANCEY 1999). Als problematisch erwies sich hierbei die große Heterogenität der Keime, für die Milch ein ausgezeichnetes Wachstumsmedium ist. Weiterhin werden die Komponenten des Immunsystems in der Milch verdünnt und durch Fett und Kasein des Sekrets in ihrer Funktion gehemmt. Zusätzlich erschwert die große Oberfläche des Milchdrüsenepithels eine genügende Präsenz von Immunzellen (COLDITZ u. WATSON 1985, YANCEY 1999). COLDITZ u. WATSON (1985) sahen ein weiteres großes Problem der parenteralen Immunisierung in der intakten Blut-Euter-Schranke, die nur wenige der gebildeten Antikörper in das Euter übertreten lässt. Suboptimale Applikationsformen oder die Wahl ungeeigneter Antigene scheinen einen weiteren Erklärungsansatz dafür zu geben, dass bis heute nur wenige Vakzinen in der Mastitisbekämpfung eingesetzt werden können (PETZL u. SCHUBERTH 2012). Da die Anwendung von Antibiotika im Sinne des Verbraucherschutzes minimiert werden sollte, kann die Impfung den großen Vorteil der Rückstandsfreiheit bieten (TALBOT u. LACASSE 2005). Sie sollte jedoch ihren Kosten gerecht werden, keine Impfschäden und keinen Rückgang der Milchleistung verursachen (ERSKINE 2012). Im Folgenden soll ein Überblick zu den bisher üblichen Vakzinierungsversuchen gegen majorpathogene Bakterien gegeben werden.

2.3.3.1 *Streptococcus uberis*-Vakzinen

Die problematische Bekämpfung von *Sc. uberis* als Verursacher von Mastitiden führte zu einigen wenigen Forschungsprojekten hinsichtlich einer Vakzinierung (ERSKINE 2012). Zuerst konnte FINCH et al. (1994) mit Hilfe eines intramammär verabreichten Inaktivatimpfstoffes vor der experimentellen Neuinfektion des gleichen Bakterienstammes schützen. Im Gegensatz dazu waren bei parenteraler Verabreichung der Vakzine Keime in der Milch nachweisbar, die, wenn auch in deutlich geringerer Anzahl vorhanden, eine Euterentzündung verursachten. Bei Feldversuchen von CALZOLARI et al. (1997) und GIRAUDO et al. (1997) war mittels Verwendung eines Inaktivatimpfstoffes keine signifikante Änderung der Mastitisinzidenz bezüglich *Sc. uberis* erkennbar. Die erste Lebendvakzine testeten HILL et al. (1994) bei subkutaner Applikation und zusätzlicher Instillation von Zellwandbestandteilen in die Zitzenzysterne. Im Serum der vakzinierten Tiere war ein signifikanter Anstieg der spezifischen IgG₂ zu beobachten. Trotz der Abwesenheit von entsprechenden Antikörpern und neutrophilen Granulozyten und einer Lymphozytenproliferation in der Milch, traten nach Neuinfektion mit dem Impfstamm weniger klinische Erkrankungen auf als in der Kontrollgruppe. DENIS et al. (2011) konnten dies später durch eine durch T-Zellen vermittelte Immunität gegen *S. uberis* erklären. Eine weiterführende Arbeit von FINCH et al. (1997) zeigte, dass die entsprechende Impfung keinen Schutz vor anderen *Sc. uberis*-Stämmen bietet. LEIGH (1999, 2000) schlussfolgerte, dass durch eine Lebendvakzine die bakterielle Kolonisation in Abwesenheit einer Entzündungsreaktion verhindert wurde, weitere Forschungsarbeit jedoch aufgrund der Stamm-Spezifität unergiebig wäre. Weiterhin berichtet dieser Autor von seinen erfolgreichen Impfversuchen mit einer *Subunit*-Vakzine. Diese enthielt den Virulenzfaktor Plasminogen-Aktivator (PauA), der das Überleben von *Sc. uberis* in Geweben sichert. Feldversuche hierzu fanden jedoch bisher nicht statt (ERSKINE 2012), obwohl das Gen für PauA in nahezu allen *Sc. uberis*-Stämmen vorkommt (LEIGH 1999). Zuletzt nutzten PRADO et al. (2011) das kurz zuvor identifizierte *Sc. uberis*-Adhäsionsmolekül (SUAM), welches ebenfalls in sehr vielen Stämmen weltweit auftritt, als Antigen für eine subkutane Vakzinierung. Dabei waren in Serum und Kolostrum spezifische Antikörper nachweisbar, welche an Drüsenepithelzellen in-vitro die Adhärenz sowie das Eindringen von *Sc. uberis* verhindern konnten. Bisher sind dazu keine Folgestudien veröffentlicht.

2.3.3.2 *Staphylococcus aureus*-Vakzinen

Die Entwicklung einer Vakzine gegen *S. aureus*-Mastitis war von deutlich größerem Interesse für die Wissenschaftler als jene gegen Streptokokken (PYÖRÄLÄ 2002), wobei *S. aureus* durch erhebliche Stammunterschiede, eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die auch eine intrazelluläre Persistenz ermöglichen, und den schwierigen Nachweis durch zyklische Ausscheidung eine große Herausforderung an die Forschung darstellt (ERSKINE 2012). Zudem führt schon eine natürliche Infektion nicht zu einer vollständigen Immunität (TALBOT u. LACASSE 2005). Einige Vakzinen konnten Spontanheilungsraten verbessern oder den Schweregrad von Erkrankungen senken, bisher konnte jedoch keine vor Neuinfektionen schützen (ZECCONI 2010).

Inaktivierte Bakterien und Toxine

Bei den ersten Versuchen in den 1960er Jahren wurden vorerst vor allem Inaktivatimpfstoffe verabreicht. Diese waren meist nicht in der Lage Neuinfektionen zu verhindern oder vor schweren klinischen Mastitiden zu schützen (MELLENBERGER 1977). Auch weitere Untersuchungen zur Anwendung von inaktivierten ganzen Bakterien erbrachten kaum zufriedenstellende Ergebnisse mit lediglich erzielten Teilerfolgen hinsichtlich einer verbesserten Selbstheilungsrate (PANKEY et al. 1985) oder einer reduzierten Neuinfektionsrate bei der Hälfte der Impftiere (NICKERSON et al. 1993). Da in letzterer Studie nur acht Tiere vakziniert wurden, erscheint das Ergebnis fragwürdig, obwohl entsprechende Antikörper in Serum und Milch nachgewiesen werden konnten. Bei LEITNER et al. (2003^A) zeigten sich 70% der mit einer aus drei inaktivierten Feldisolaten bestehenden Vakzine namens Mastivacs I[®] immunisierten Tiere geschützt gegen die experimentelle Provokation einer Infektion. Im Feldversuch konnte eine Wirkung dagegen nicht signifikant bewiesen werden, die geimpften Färsen hatten jedoch eine niedrigere SCC sowie eine höhere Milchleistung als die Kontrolltiere (LEITNER et al. 2003^B). In den USA ist die Totvakzine Lysigin[®] von Boehringer Ingelheim Vetmedica, ein pentavalenter Impfstoff aus drei bekapselten Serotypen von *S. aureus*, kommerziell erhältlich. LUBY et al. (2007) vakzinierten damit hochtragende Färsen und infizierten die Tiere etwa eine Woche nach Beginn der Laktation mit heterologen *S. aureus*-Stämmen. Trotz des Nachweises von Impfantikörpern in der Milch schieden alle Tiere bis auf eines bis zum Ende des Versuches die entsprechenden Stämme aus.

Auch in einer weiterführenden Studie von MIDDLETON et al. (2009), bei der 44 Kühe zweimal im Abstand von 14 Tagen geimpft wurden, konnten Neuinfektionen nicht verhindert werden. Die Autoren vermuteten insuffiziente opsonierende Antikörper in der Milch als Grund hierfür.

NICKERSON et al. (1993) und NORDHAUG et al. (1994) sowie zahlreiche weitere Untersucher verwendeten neben einem abgetöteten Bakterium auch deren inaktivierte Toxine als Antigene. Letztere konnten in einem Feldversuch einen positiven Effekt auf die Inzidenz klinischer Mastitiden sowie auf die somatische Zellzahl in 16 norwegischen Milchviehbetrieben feststellen, es ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz der Ergebnisse.

Einen weiteren Zusatz zum inaktivierten Bakterium erprobten WALLEMACQ et al. (2012) an einem Mausmodell für *S. aureus*-Mastitis. Sie verwendeten monoklonale Antikörper, um die zelluläre Immunantwort durch zytotoxische T-Zellen zu verstärken und konnten zumindest den Schweregrad der Ausprägung einer klinischen Erkrankung reduzieren.

Stallspezifische inaktivierte Bakterien

In Deutschland wurden auch stallspezifische Vakzinen eingesetzt, die vor Ort isolierte *S. aureus* in inaktiverter Form enthalten. HOEDEMAKER et al. (2001) verabreichten 22 Kühen und 13 Färsen den zuvor aus einem Herdisolat hergestellten Impfstoff als Grundimmunisierung zweimal im Abstand von drei Wochen und zum Trockenstellen, sowie fünf und zwei Wochen vor dem Kalbetermin. Die Auswahl der Herde erfolgte aufgrund einer hohen *S. aureus*-Prävalenz, die in der auf die Vakzinierung folgenden Laktation bei Versuchs- als auch Kontrolltieren zunächst sogar anstieg. Auch bezüglich der SCC bestanden keine Unterschiede zwischen den Gruppen, obwohl laut Antikörpertiter eine Immunreaktion auf die Impfung stattgefunden hatte. TENHAGEN et al. (2001) führten einen ähnlichen Versuch mit 164 Färsen durch, denen fünf und zwei Wochen vor dem erwarteten Geburtstermin eine stallspezifische Vakzine appliziert wurde. Auch hierbei konnte keine Abnahme der Prävalenz von *S. aureus* im Vergleich zu den Kontrolltieren verzeichnet werden. Lediglich die somatische Zellzahl schien bei den geimpften Tieren geringer zu sein.

Lebende Bakterien

Zeitweise wurde auch der Einsatz von Lebendimpfstoffen erprobt. Die Immunantwort besteht vor allem aus der Bildung von IgG₂ (WATSON 1992). Beispielsweise verabreichte WATSON (1984) vier Färsen einen attenuierten *S. aureus*-Stamm, der neben subkutanen Abszessen an der Injektionsstelle eine protektive Immunität gegen erneute Infektion mit den Impfkernen gewährleisten konnte.

PELLEGRINO et al. (2008) vakzinieren mit einer avirulenten Mutante von *S. aureus* hochtragende Färsen, die nach der Abkalbung nur zur Hälfte eine Mastitis nach experimenteller Infektion mit dem homologen virulenten Stamm ausbildeten, da ein deutlicher Anstieg der spezifischen Antikörper zu verzeichnen war. Zusätzlich war die Milchleistung bei den Impftieren um 20 % höher als bei den Kontrolltieren. In einer weiterführenden Studie konnten PELLEGRINO et al. (2010) bei fünf Färsen mittels des avirulenten Stammes eine genügende Entstehung spezifischer opsonierender Antikörper zur Verhinderung einer Infektion von heterologen *S. aureus*-Stämmen induzieren.

Weitere Antigene

Laut Literatur wurden im Verlauf der Jahre diverse Zellwandbestandteile und Virulenzfaktoren von *S. aureus* als Impfantigene mit mehr oder weniger Erfolg getestet. An dieser Stelle sollen diese nur exemplarisch aufgezählt werden (siehe Tab. 5). Das TRAP als Membranprotein vieler verschiedener Staphylokokkenstämme hat derzeit das größte Potential ein Antigen eines Impfstoffes für diese Keime zu werden (ERSKINE 2012). Das SAAC soll an anderer Stelle erläutert werden (siehe Kapitel 2.3.3.4).

Tab. 5: Antigene von *S. aureus*-Vakzinen

Protein A	PANKEY et al. (1985)
Exopolysaccharid	GIRAUDO et al. (1997)
Bakterienlysat in Mikropartikeln	O'BRIEN et al. (2001)
Clumpingfaktor A und Fibronectin-binding-Protein	SHKRETA et al. (2004)
rekombinantes Enterotoxin C	CHANG et al. (2008)
Eisen-regulierendes Protein	STER et al. (2010)
Exopolysaccharid SAAC (slime associated antigenic complex)	PRENAFETA et al. (2010)
TRAP (target of RNA III activating protein)	LEITNER et al. (2011)

2.3.3.3 *Escherichia coli*-Vakzinen

Aufgrund des hohen Risikos einer schwerwiegenden klinischen Mastitis und den damit verbundenen Verlusten besteht unvermindert großes Interesse an der Entwicklung einer effektiven Immunisierung zur Bekämpfung von Colimastitiden (WILSON u. GONZÁLEZ 2003), auch wenn vermutet wurde, dass keine vollständige Immunität erlangt werden kann (BRAMLEY et al. 1981).

Erste Versuche zur Entwicklung einer Vakzine führten WILSON et al. (1972) durch, indem sie einige Tage vor der Abkalbung in je zwei Euterviertel von drei Färsen verschiedene *E. coli*-Stämme instillierten, die zuvor mit Formalin behandelt worden waren. Am zweiten und dritten Tag post partum konnten deutliche Unterschiede der Antikörperkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrolltieren verzeichnet werden. In einem weiterführenden Experiment wurde gezeigt, dass diese spezifischen Antikörper nur die homologen Stämme hemmen konnten (WILSON 1972). Später verabreichten RAINARD u. CAFFIN (1983) zwei Kühen einen inaktivierten *E. coli*-Stamm, der bereits durch HILL et al. (1978) in Zusammenhang mit Mastitis beschrieben wurde, auf dem subkutanen Weg zum Zeitpunkt des Trockenstellens sowie eine intramammäre Boosterung fünf Wochen später. Dies führte bei induzierter Neuinfektion zu keiner veränderten humoralen Immunantwort im Vergleich zu den Kontrolltieren. Von RAINARD (1983) durchgeführte In-vitro-Tests hierzu ließen jedoch vermuten, dass die Immunisierung zu einer verbesserten Chemotaxis und Opsonierung führt. Dennoch äußerte SMITH (1983) allgemeine Zweifel an der Praktikabilität einer Impfung. Mittels autogenen Vakzinen konnte zuvor die Rate der akuten Ausbrüche von *E. coli*-Mastitiden, jedoch nicht die der Neuinfektionen gesenkt werden (MELLENBERGER 1977).

core-antigen-Vakzinen

Der größte Fortschritt in der Bekämpfung von klinischen Colimastitiden wurde durch die Einführung von *core antigen*-Vakzinen gemacht. Diese bestehen aus inaktivierten Stämmen von *E. coli* oder *Salmonella spp.*, die kein vollständiges LPS ausbilden und als *rough mutants* bezeichnet werden. Die am besten erforschten Stämme sind *E. coli* J5, eine Mutante von *E. coli* O111:B4 ohne O-spezifische Seitenkette, sowie Re-17, eine Mutante von *Salmonella Typhimurium* (YANCEY 1999, WILSON u. GONZÁLEZ 2003).

Als Immunantwort auf die Exposition mit den defekten LPS bildet der Organismus Antikörper, welche eine Kreuzreaktivität mit nahezu allen Gram-negativen Bakterien,

die eine Colimastitis verursachen können, aufweist (TYLER et al. 1990^A, CHAIYOTWITTAYAKUN et al. 2004). Mit der Höhe der Antikörpertiter korreliert eine geringere Mastitisinzidenz (TYLER et al. 1988). Durch die Kreuzreaktivität besteht ein allgemeiner Immunschutz gegen septikämische Erkrankungen, auch bei den über das Kolostrum passiv immunisierten Neonaten (TYLER et al. 1990^B).

Den ersten Feldversuch führten GONZÁLEZ et al. (1989) durch, in dem sie 246 Tieren zweimal während der Trockenstehperiode und einmal nach der Kalbung eine J5-Vakzine subkutan verabreichten und anschließend mit 240 Kontrolltieren verglichen. 29 der nicht geimpften und nur sechs der geimpften Kühe erlitten eine durch coliforme Keime verursachte Mastitis. Somit konnte eine präventive Wirksamkeit des Impfstoffes gegen natürlich auftretende Infektionen postuliert werden. Auf diese Erkenntnis folgten weitere Feldversuche (siehe Tab. 6), die ebenfalls hoffnungsvolle Ergebnisse erbrachten.

Tab. 6: Feldversuche zur Wirksamkeit von J5-Vakzinen hinsichtlich der Inzidenz von klinischen Colimastitiden (CCM), modifiziert nach YANCEY (1999)

	Gruppe	Vakzine	Impf-dosen	Anzahl der Tiere	Fälle von CCM	Inzidenz in %	Inzidenz-abnahme in %
GONZÁLEZ et al. (1989)	NG	-	0	240	29	12,77	80
	G	J5	3	246	6	2,57	
CULLOR (1991)	NG	Placebo	3	229	25	10,9	72
	G	J5	3	212	7	3,3	
HOGAN et al. (1992 ^A)	NG	-	0	112	12	10,7	75
	G	J5	3	113	2	1,8	

G = geimpft, NG = nicht geimpft

HOGAN und Mitarbeiter (1992^A) konnten jedoch nachweisen, dass nicht die natürliche Infektion verhindert, sondern nur die Inzidenz und der Schweregrad der Ausprägung einer akuten Mastitis durch die Immunisierung reduziert wurden. Nur 20 % ihrer vakzinierten und infizierten Tiere erkrankten an einer klinischen Mastitis im Gegensatz zu 67 % auf der Seite der ungeimpften und infizierten Tiere.

Zusätzlich wurde die Dauer einer Infektion deutlich verkürzt (HOGAN et al. 1995). All diese Effekte einer Vakzination konnten auch für Färsen bestätigt werden (HOGAN et al. 1999).

Ein Infektionsexperiment hatte jedoch ein anderes Resultat. In den Untersuchungen von HILL (1991) konnte die *core antigen*-Vakzine nicht gegen die provozierte Invasion eines virulenten *E. coli*-Stammes schützen.

WILSON et al. (2007^A) bestätigten noch einmal, dass die Impfung zwar keine vollständige Immunität erzielen kann, jedoch höhere Antikörperspiegel zu einer schnelleren Eliminierung von *E. coli* aus der Milch und einer signifikant niedrigeren somatischen Zellzahl (490.000 Zellen/ml) ihrer Impflinge im Vergleich zu den Kontrolltieren ihres Versuches (5.429.000 Zellen/ml) führten. Auch bei den Untersuchungen von WILSON et al. (2009) konnten hohe spezifische Antikörpertiter als Reaktion auf die Impfung nachgewiesen werden, jedoch nicht über den 75. Laktationstag hinausgehend.

Diese relativ kurze Dauer des Immunschutzes durch das traditionell durchgeführte Impfschema mit zwei bis drei Impfdosen konnte auch von ERSKINE et al. (2007, 2010) nachgewiesen werden. Diese Autoren führten Hyperimmunisationsversuche mit zusätzlich applizierten Dosen im Abstand von mehreren Wochen nach der Abkalbung durch und konnten anschließend IgG₁ und IgG₂ in höherer Konzentration deutlich länger nachweisen. Bei Applikation von fünf Impfdosen in jeweils wechselnde Lokalisationen am Tierkörper, war eine weitere Steigerung der humoralen Immunantwort zu erreichen (ERSKINE 2010). Die Antikörperbildung konnte außerdem durch zeitgleiche Verabreichung von Vitamin D₃ (REINHARDT et al. 1999) und Vitamin E/Selen (PANOUSIS et al. 2001) verstärkt werden. Der genaue Mechanismus dieser protektiven Wirkung ist jedoch unbekannt. Vermutet wird eine Immunität durch verstärkte PMN-Einwanderung (DOSOGNE et al. 2002).

MUSSER UND ANDERSON (1996) stellten einen kurzzeitigen Rückgang der Milchleistung um 7 % bei Tieren fest, die während der Laktation geimpft wurden. Sobald eine Vakzinierung mit J5-Vakzinen jedoch regulär zum Zeitpunkt des Trockenstellens vorgenommen wurde, hatte dies hierauf keinen Einfluss. Langfristig war durch die Impfung sogar eine verbesserte Milchleistung nach Auftreten von klinischen Erkrankungen festzustellen (TOMITA et al. 1998, WILSON et al. 2007^A, 2008, 2009).

Eine von DEGRAVES und FETROW (1991) aufgestellte Kosten-Nutzen-Analyse zeigte, dass eine Vakzination bereits bei mehr als einem Prozent klinischen Colimastitiden in einer Herde profitabel sein kann, auch, da mastitisbedingte Abgänge oder Todesfälle durch eine Vakzination minimiert werden können (WILSON et al. 2007^B, 2009).

In den USA werden J5-Vakzinen im Rahmen von Eutergesundheitsprogrammen in vielen Herden regulär eingesetzt (ERSKINE 2012). Die dort kommerziell erhältlichen Impfstoffe J-VAC[®] (Merial Ltd. Athens, Georgia), der zum Trockenstellen und zwei Wochen vor der Abkalbung verabreicht wird, und J5 Bacterin[®] (Pharmacia&Upjohn, Kalamazoo, Michigan), bei dem eine zusätzliche dritte Applikation zum Kalbetermin erfolgt, unterschieden sich in ihrer Wirkung nicht (TOMITA et al. 2000).

Getestet wurde auch die Immunisierung mittels *core antigen* von der *Salmonella Typhimurium*-Mutante Re-17. MC CLURE et al. (1994) verglichen 646 Impftiere mit ebenso vielen Kontrolltieren hinsichtlich des Auftretens einer Colimastitis, die zu 96 % durch *E. coli* verursacht wurde. Durch die Kreuzreaktivität der Antikörper waren bei den vakzinierten Tieren eine Senkung der Inzidenz und des Schweregrades bei klinischen Mastitiden nachzuweisen.

Weitere Antigene

LIN et al. (1998) versuchten eine Immunisierung mittels Eisen-Enterobactin-Rezeptor (FepA), einem Zellwandbestandteil von vielen coliformen Bakterien, und konnten spezifische Antikörper in Serum und Milch nur für 14 Tage nachweisen. Auch TAKEMURA et al. (2002) beschäftigten sich mit den Proteinen der Zellwand, welche eine Funktion in der Eisenaufnahme des Bakteriums haben. Diese Autoren verwendeten den Eisen-Citrat-Rezeptor (FecA) um Kühe gegen Colimastitis zu impfen, konnten jedoch trotz Immunantwort mit erhöhten Antikörperspiegeln nicht vor einer induzierten schweren klinischen Mastitis schützen.

Eine in Japan kommerziell erhältliche Vakzine gegen enterotoxische *E. coli* (Imocolibov[®], Merial Ltd., Tokio), die zur Diarrhöprophylaxe angewendet wird, wurde von MORIMOTO et al. (2011) hinsichtlich ihrer möglichen präventiven Wirksamkeit gegen Euterinfektionen getestet. Die Mastitisinzidenz unterschied sich nicht zwischen Impf- und Kontrolltieren, lediglich waren in der Kontrollgruppe schwerere Fälle von Colimastitiden zu verzeichnen.

Antigenkombinationen von *E. coli* mit anderen Bakterien

In Deutschland und der EU erfolgte kürzlich die Einführung von Startvac® (HIPRA Düsseldorf), welches aus der Kombination einer J5-Vakzine und den Antigenen des *Slime Associated Antigenic Complex* (SAAC) des *S. aureus*-Stammes SP140 besteht. Die Exopolysaccharide des SAAC sind an der Biofilmbildung als Überlebensstrategie von *S. aureus* und anderen Staphylokokken wie einigen KNS beteiligt. Im Falle der bovinen Mastitis wurde vor allem das poly-N-acetyl- β -1,6Glukosamin (PNAG) als Exopolysaccharid von *S. aureus* nachgewiesen (PRENAFETA 2010). Zuerst führten PÉREZ et al. (2009) Infektionsversuche an Schafen durch, nachdem sie diese mit reinem PNAG, PNAG mit verschiedenen Adjuvantien, abgetöteten *S. aureus* in ungebundener Form oder verschiedenen biofilmassoziierten inaktivierten *S. aureus* impften. Den größten Immunschutz mit spezifischen Antikörpern gegen das PNAG erlangten die mit stark biofilmbildenden Bakterien vakzinierten Tiere. Diese waren die einzigen, die keine schwere Mastitis erlitten. PRENAFETA et al. (2010) ergänzten die Versuchsreihe zur Eignung der SAAC-spezifischen Antikörper zur Abwehr der Mastitis beim Rind, in dem sie vier Färsen mit einem inaktivierten, nur wenig SAAC produzierenden *S. aureus* und vier Färsen mit einem hochgradig SAAC synthetisierenden *S. aureus* impften. Bei Letzteren konnten nach experimenteller Neuinfektion mit einem virulenten Stamm die meisten Antikörper in Serum und Milch nachgewiesen werden. Jedoch konnte eine Invasion der Keime nicht vermieden werden, die spontane Eliminierung aus der Milch fand schneller statt als bei den vier Kontrolltieren. Zur Einführung der Vakzine Startvac® fanden laut Hersteller einige Feldversuche in Spanien und Portugal statt. Die erste zugängliche Studie zur Wirksamkeit wurde kürzlich von MARCH et al. (2012) veröffentlicht. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Impfung die Inzidenz der Euterinfektionen mit *S. aureus*, coliformen Keimen und auch KNS gesenkt und der Schweregrad von klinischen Mastitiden minimiert werden kann. UHLENBROCK et al. (2012) konnten die Wirksamkeit der Vakzine gegen KNS in einem Bestand mit gehäuft auftretenden KNS-Infektionen nicht bestätigen. Zudem kritisierten sie das unpraktikable Impfregime (siehe Kapitel 2.3.3.6), da Einzeltiere aus verschiedenen Haltungsgруппen identifiziert werden müssen.

Applikationsformen

Im überwiegenden Fall wird nicht lokal, sondern systemisch vakziniert, was zur Folge haben kann, dass keine passenden adaptiven Immunmechanismen ablaufen.

Systemisch gebildete Antikörper erreichen womöglich nicht das Lumen der Milchdrüse. Gegen eine lokale Vakzinierung spricht jedoch, dass nach natürlicher Infektion kaum eine langanhaltende Immunität erreicht wird (PETZL u. SCHUBERTH 2012).

Im Falle der J5-Vakzinen wird regulär eine subkutane Injektion durchgeführt, ob diese am Hals oder euternah im Bereich der supramammären Lymphknoten vorgenommen wird, hat keinen Einfluss auf die Immunantwort (TOMITA et al. 1998). SMITH et al. (1999) versuchten die subkutane Injektion mit einer intramammären Instillation der Vakzine zu kombinieren, konnten jedoch kaum Vorteile erkennen. HOGAN et al. (1997) testeten das gleiche Impfschema mit Injektion 14 Tage vor und Instillation sieben Tage nach dem Trockenstellen sowie einer zweiten Injektion knapp drei Wochen später. In ihren Untersuchungen konnte ein erhöhter Antikörperspiegel festgestellt werden. Die Tiere entwickelten jedoch auch Fieber nach der Verbringung der Antigene in das Euter. Laut COLDITZ u. WATSON (1985) spricht außerdem die Zerstörung des Keratinfropfens als natürliche Barriere sowie das Risiko einer Kontamination gegen eine Instillation über die Zitze in der Trockenstehperiode. In der Laktation würde die Vakzine jedoch sofort wieder ausgespült werden und dementsprechend uneffektiv sein.

Bei systemischer Applikation der J5-Vakzine sieht das Impfschema eine zwei- oder dreifache Verabreichung vor. Bei letzterer Variante waren die größten Erfolge hinsichtlich einer Senkung der Mastitisinzidenz zu verzeichnen. Die Impfung sollte dann zum Zeitpunkt des Trockenstellens, vier Wochen später sowie etwa eine Woche nach der Abkalbung erfolgen (WILSON u. GONZÁLEZ 2003). Für Startvac® gilt laut Hersteller HIPRA ein modifiziertes Impfregime. Je zwei Milliliter Vakzine werden am 45. und zehnten Tag vor und am 52. Tag nach der Abkalbung intramuskulär verabreicht.

2.3.3.4 Adjuvantien

Adjuvantien sind Trägerstoffe oder Substanzen, die die Immunantwort einer Vakzine modulieren sollen. Anwendung in veterinärmedizinischen Impfstoffen fanden bisher meist Mineralsalze, Lipidpartikel wie Liposome oder Emulsionen, sowie immunstimulierende Adjuvantien. Inaktivierte und attenuierte Bakterien als Antigene besitzen jedoch meist noch viele Merkmale ihrer pathogenen Vorläufer und können somit auch ohne Adjuvantien eine ausreichende Immunantwort hervorrufen (SINGH u. O'HAGAN 2003).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Auswahl des Projektbetriebes

Ausgewählt als Projektbetrieb wurde eine Milchviehanlage in Schwabhausen (Thüringen), zu welcher 1.200 Tiere gehören, von denen 1.000 melkende Kühe sind. Aufgrund der Befunde der monatlichen Milchleistungsprüfung (MLP) sind subklinische Mastitiden immer wieder zu vermuten, klinische Mastitiden treten sporadisch auf.

3.2 Beschreibung des Betriebes

Bei den Tieren der Anlage in Schwabhausen handelt es sich um eine Hochleistungsherde, deren Melkdurchschnitt sich bei 30.000 Litern Milch pro Tag befindet. Dies entspricht einem Herdendurchschnitt von knapp 10.000 Litern Milch pro Kuh und Jahr. Das Erstkalbealter der Kühe liegt bei 25 Monaten, die Rastzeit bei 60 Tagen und die Zwischenkalbezeit bei 403 Tagen. Eine Nutzung der Tiere erfolgt im Durchschnitt für 2,9 Laktationen.

3.2.1 Haltung und Fütterung der Tiere

Die Rinder werden in Boxenlaufställen in 50er Gruppen gehalten. Die Liegeboxen sind mit Gummimatten sowie Stroh und Kalk versehen, um Kuhkomfort und Hygiene zu gewährleisten. Für die Abkalbung stehen vier große Tiefstreuboxen zur Verfügung, in denen gleichzeitig drei Tiere untergebracht werden. Eine Umstallung je nach Anzeichen der nahenden Geburt erfolgt zweimal die Woche aus den Trockenstehergruppen.

Die Fütterung der Rinder wird mit einer totalen Mischration (TMR) durchgeführt, die dem Bedarf gut angepasst erscheint, da nur selten klinische Energiemangelzustände wie Ketosen auftreten (ca. 10 Tiere pro Jahr).

3.2.2 Melkvorgang

Die Kühe werden in einem Karussell mit 36 Plätzen dreimal am Tag gemolken. Die Reinigung der Zitzen und Euter erfolgt mit industriell gewaschenen und getrockneten Eutertüchern, die Desinfektion des Melkzeuges zwischen den Tieren geschieht mittels Tauchbädern mit Wasser und Peressigsäure.

3.2.3 Trockenstellen

Das Trockenstellen der Kühe wird einheitlich und abrupt unter antibiotischem Schutz durchgeführt. Die Tiere stehen im Durchschnitt zwischen 50 und 56 Tagen trocken.

3.3 Auswahl der Versuchstiere

Es erfolgte eine zufällige Auswahl von insgesamt 50 Versuchstieren. Einzige Voraussetzung für die Teilnahme am Projekt war das erreichte Ende der Laktation mit makroskopisch unverändertem Milchsekret.

3.4 Versuchsaufbau

Zeitpunkt 1: Trockenstehperiode

Tag des Trockenstellens:	MP 1 (SCC, BU, CRP, Endotoxin)
ca. 8 Wochen ante partum (a. p.)	BP 1 (Antikörper, Haptoglobin)
	Impfung 1

in Trockenstehperiode (5 Wochen a. p.):	Impfung 2
---	-----------

Zeitpunkt 2: kurz nach der Geburt

3 Tage post partum (p. p.):	MP 2 (CRP, Endotoxin)
	Impfung 3

Zeitpunkt 3: Hochlaktation

30 Tage p. p.:	MP 3 (SCC, BU, CRP, Endotoxin)
	BP 2 (Antikörper, Haptoglobin)

Laktation

ab dem 2. Laktationsmonat	
bis zum 10. Laktationsmonat	
bzw. letzter Laktationsmonat	Milchleistungsprüfungsdaten (SCC)

MP = Milchprobe; BP = Blutprobe; BU = Bakteriologische Untersuchung

3.4.1 Isolierung des Impfstammes von *E. coli*

Aus Kotproben, welche vor Versuchsbeginn im Betrieb genommen worden waren, erfolgte eine Isolierung und Identifizierung von *E. coli* im Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig. Kotproben wurden dazu auf einem Blut-, einem Gassner- und einem Sabouraud-Agar ausgestrichen und die Platten anschließend bei 37 °C 24 bzw. 48 Stunden bebrütet. Anhand der Kulturmorphologie und des Hämolyseverhaltens sowie der durchgeführten Gram-Färbung und Mikroskopie erfolgte die Untersuchung der Primärkulturen. Zwei bis vier Millimeter große, runde, grau-weiße und glattrandige, laktosefermentierende, Oxidase-negative Kolonien, die im HIB-Medium Urease-negativ, Harnstoff-negativ, Indol-positiv und beweglich sowie auf Kligler-Agar Glukose-positiv, Laktose-negativ waren und mit starker Gasbildung wuchsen, in einigen Fällen Hämolyse und Schleimbildung zeigten, wurden als *E. coli* differenziert. Gram-negative, Oxidase-negative, auf Gassner-Agar mit Blauverfärbung wachsende Kolonien wurden den Enterobacteriaceae zugeordnet. Nach der Identifizierung wurde die *E. coli*-Kolonie wiederum auf einen Blutagar für weitere 24 Stunden subkultiviert. Anschließend erfolgte ein gekühlter Transport der Kulturen zur Fa. Dr. Felgenträger & Co.-Öko-chem. und Pharma GmbH.

3.4.2 Herstellung der Vakzinen

Die Herstellung der bestandsspezifischen Vakzine aus den *E. coli*-Isolaten wurde von der Firma Dr. Felgenträger & Co.-Öko-chem. und Pharma GmbH in Dessau-Roßlau durchgeführt. Von den *E. coli*-Isolaten wurden vorerst Stammhaltungskulturen angelegt, um jederzeit auf die Isolate zurückgreifen zu können. Das allgemeine Prinzip der Herstellung für bestandsspezifische Impfstoffe soll im Folgenden erläutert werden (siehe auch Abbildung 2). Die aus den Vorkulturen angelegten Hauptkulturen wurden auf Reinheit an *E. coli* überprüft und, nach Inaktivierung der Erreger durch Formaldehyd (0,2 %) über 48 Stunden bei 37 °C, der Abtötungserfolg durch Beimpfen einer Blutagarplatte und Inkubation über 48 Stunden bei 37 °C überprüft. Bei erfolgreicher Inaktivierung wurde die Gesamtkeimzahl mittels Zählkammer bestimmt und anschließend, bei der Vermischung mit Konservierungsmitteln und Adjuvantien, auf $1,0 \times 10^8$ Keime/ml eingestellt. Zur Konservierung der Inaktivatvakzine diente 0,25 % Phenol, als Adjuvans 10 % Aluminiumhydroxid.

Nach der Abfüllung in Flaschen wurde eine nach dem Europäischen Arzneibuch (Pharmacopoea Europaea, Ph. Eur.) vorgeschriebene Sterilitätsprüfung durchgeführt. Erst dann wurde der Impfstoff für den Versand freigegeben.

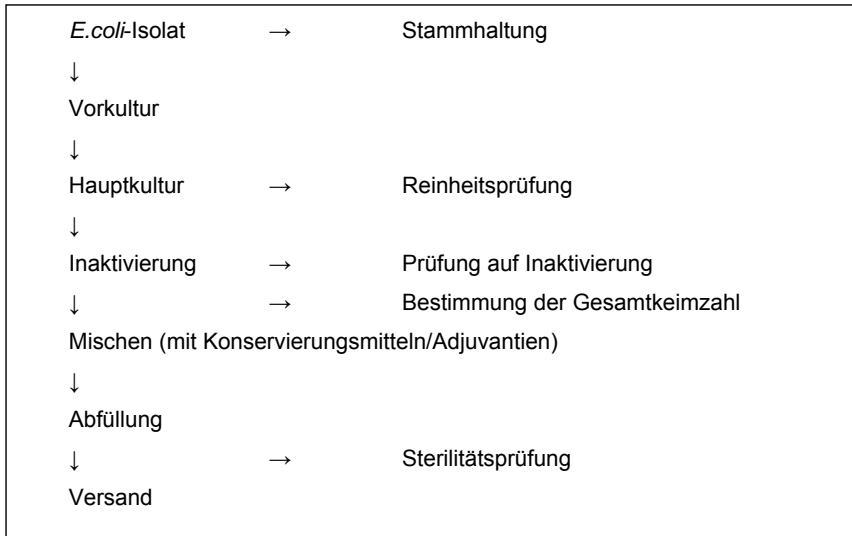


Abb. 1: Allgemeines Schema der Impfstoffherstellung

Im Speziellen erfolgte die Herstellung von vier verschiedenen Vakzinen. Impfstoff A enthielt inaktivierte Originalkulturen von *E. coli-large colony variants* (LCV), während Impfstoff B *E. coli-small colony variants* (SCV) enthielt. Zur Induktion der SCV-Kolonien wurde das Antibiotikum Streptomycin verwendet. In der Vakzine C wurden LCV und SCV zu gleichen Teilen gemischt. Zum Impfstoff D wurde zu der Mischung aus LCV und SCV ein betriebsinternes Adjuvants („20 % SO“) gegeben, welches aufgrund noch nicht veröffentlichter Daten an dieser Stelle nicht näher erläutert werden kann.

Impfstoff A: LCV

Impfstoff B: SCV

Impfstoff C: LCV + SCV

Impfstoff D: LCV + SCV + 20 % SO

3.4.3 Bildung von Impfgruppen, Grundimmunisierung

Aus den 50 ausgewählten Versuchstieren wurden je zehn nach dem Zufallsprinzip einer Impfgruppe zugeordnet. Die Kühe traten in Zehnergruppen zeitlich versetzt in die Studie ein, da das Betriebsmanagement ein zeitgleiches Trockenstellen von 50 Tieren nicht ermöglichte. Somit wurden die fünf Gruppen im Abstand von ein bis drei Wochen gebildet, sobald sich die nächsten zehn Kühe am Ende ihrer Laktation befanden. Die erste Gruppe fungierte als unbehandelte Kontrolle. Die übrigen vier Impfgruppen erhielten am Tag des Trockenstellens (etwa acht Wochen ante partum), sowie fünf Wochen vor dem errechneten Geburtstermin und drei Tage nach der tatsächlichen stattgefundenen Abkalbung eine subkutane Injektion mit 5 ml des jeweiligen Impfstoffes. Diese wurde seitlich am Hals unter vorheriger Fixation der Tiere im Fressgitter durchgeführt. Gruppe A bekam die LCV-Vakzine, Gruppe B die SCV-Vakzine. Gruppe C wurde die Kombivakzine verabreicht, Gruppe D die Kombivakzine mit SO-Zusatz.

3.4.4 Probenentnahme

Das Projekt beinhaltete Probenentnahmen über einen Zeitraum von sieben Monaten (Oktober 2008 bis April 2009), wobei auf das Tier bezogen drei Beprobungszeitpunkte (Zeitpunkt 1, 2 und 3) eingehalten werden sollten. Zu jedem der Termine wurden eine kurze Überprüfung des Allgemeinbefindens sowie eine adspektorische und palpatorische Euteruntersuchung durchgeführt. Bei letzterer wurden die Zitzen und das Drüsenparenchym der Tiere, sowie die Handmelkbarkeit und Sekretbeschaffenheit der Euterviertel grobsinnlich überprüft.

3.4.4.1 Milchprobenentnahme

Zu den Zeitpunkten 1 (zum Trockenstellen), 2 (drei Tage nach der Kalbung) und 3 (30 Tage nach der Kalbung) wurden Proben vom Endgemelk auf Euterviertelebene genommen. Dies erfolgte gemäß der Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter antiseptischen Bedingungen der Fachgruppe Milchhygiene der DVG (2009) durch den Leiter und Tierarzt der Anlage, Herrn Dr. Lothar Jäkel. Nach Reinigung und Desinfektion mit 70 %igem Alkohol wurden je Viertel zwei sterile Kunststoffröhrchen, von denen einem Röhrchen Borsäure als Konservierungsstoff zugesetzt war, vollständig befüllt und anschließend umgehend gekühlt bei 4 °C versendet. Eine Ausnahme bildeten die Proben des Zeitpunktes 2, die nach ihrer Entnahme in unbehandelten Milchprobenröhrchen tiefgefroren wurden, da von dieser Milch keine

zytologischen und bakteriologischen Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Somit wurden die Proben dieses Zeitpunktes gesammelt und tiefgekühlt verschickt. Der Versand aus der Anlage fand innerhalb von 24 Stunden statt. Bei Ankunft der Proben im Labor wurden jeweils 2 ml der unbehandelten Viertelendgemelksproben entnommen und in sterile Milchprobenröhrchen oder Eppendorf-Gefäße verbracht, um die Probenverteilung zu den einzelnen Untersuchungseinrichtungen zu ermöglichen. Die mit Borsäure versetzten Röhrchen wurden umgehend zur Landesuntersuchungsanstalt für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen mit Standort Dresden transportiert. Die anderen Behältnisse wurden bis zur Untersuchung vorerst bei -20 °C tiefgekühlt gelagert.

3.4.4.2 Blutprobenentnahme

Blutprobenentnahmen erfolgten zum Zeitpunkt 1 (zum Trockenstellen) und zum Zeitpunkt 3 (30 Tage nach der Kalbung) durch Herrn Dr. Jäkel aus der Vena coccygea. Verwendung fanden Serumröhrchen, die bei 4 °C versendet wurden. Nach etwa 24-stündiger Transportzeit wurden die Proben im Labor bei 3.500 g 15 Minuten lang zentrifugiert und das gewonnene Serum anschließend in Eppendorf-Gefäße umgefüllt. Bis zur Untersuchung wurde es zunächst tiefgekühlt bei -20 °C zwischengelagert.

3.4.5 Analytische Methoden

3.4.5.1 Milchproben

Zytologische Untersuchung der Milchproben

Die zytologischen Untersuchungen der mit Borsäure versehenen Milchproben wurden in der Landesuntersuchungsanstalt (LUA) für das Gesundheits- und Veterinärwesen Sachsen mit Standort Dresden mittels Fossomatic® durchgeführt. Dies ist laut IDF (1981) die Standardmessmethode, bei der die Zellkerne in der Milchprobe mit fluoreszierendem Ethidiumbromid angefärbt und anschließend die von den Zellkernen ausgehenden Impulse im kontinuierlichen Milchfluss durch ein Mikroskop gemessen werden.

Bakteriologische Untersuchung der Milchproben

Die Isolierung und Identifizierung der Mastitisserreger erfolgte im Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität

Leipzig. Hier wurde von jeder Viertelgemelksprobe unter Verwendung von Phosphat-gepufferter Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) eine Verdünnungsreihe mit den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 angefertigt und je ein Inokulum von 0,01 ml und auch 0,01 ml der unverdünnten Milch auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Bebrütung der Platte bei 37 °C. Anhand der Auszählung der gewachsenen Kolonien wurde eine quantitative Keimzahlbestimmung vorgenommen, wobei im Falle einer Mischkultur Kolonien mit gleicher Morphologie zusammengezählt wurden. Von diesen wurden Subkulturen als Reinkulturen angelegt, um eine Erregeridentifizierung mittels MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ ionization time of flight mass spectrometry*) durchführen zu können. Verwendung fand das Gerät MALDI Typ Microflex von der Fa. Bruker (Deutschland) mit der passenden Software MALDI Biotyper 3 des gleichen Herstellers. Danach erfolgte eine Einordnung der Keime in Gruppen mit Vergabe eines Scores. Das Scoring-System ist in der Tabelle 7 aufgeführt.

Tab. 7: Keim-Scoring

0	steril
1	sonstige (Laktokokken, Mikrokokken, Aerokokken usw.)
2	Corynebakterien
3	KNS
4	Staphylococcus aureus
5	Streptokokken
6	Hefen
7	Enterokokken
8	Pseudomonaden
9	Coliforme

CRP-Bestimmung in der Milch

Der quantitative Gehalt der Milchproben an CRP wurde im Institut für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig bestimmt. Verwendung fand ein Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit 96-Kavitäten-ELISA-Platten (Costar®, Corning Inc., Acton, Massachusetts, USA), welche eine hohe Proteinbindungskapazität besitzen und mit 100 µl eines 1:2.750 verdünnten IgGs vom Kaninchen gegen humanes CRP (11 mg/ml, Fa. Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) beschichtet und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Platten-Horizontalschüttler bei 500 rpm inkubiert wurden. Als Adsorptionspuffer diente eine 0,1 molare Natriumhydrogencarbonatlösung (NaHCO_3), bevor eine zweimalige Waschung mittels Phosphat-gepufferter Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) mit 0,1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) vorgenommen wurde.

Die Milchproben wurden 1:80 und der bovine CRP-Standard von 39,2 µl/ml auf 1 bis 100 ng/ml mit Testpuffer verdünnt. Dieser Puffer beinhaltete PBS und 0,1 % Tween 20 (PBST) sowie 5 millimolare (mM) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). Nach Befüllung der Kavitäten mit je 100 µl der Proben und der beschriebenen Standardlösung erfolgte wiederum eine einstündige Inkubation, bevor die Kavitäten insgesamt viermal mit PBST gewaschen wurden.

Als kolorimetrisches Substrat, welches bereits durch GALLATI u. PRACHT (1985) beschrieben wurde, dienten 3 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und 1 mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) in 0,2 M Zitratpuffer. Dieses Substrat wurde zu je 100 µl in die Kavitäten gegeben und sechs Minuten inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 50 µl 1-molarer Schwefelsäure (H_2SO_4) pro Kavität als Lösung zum Beenden der Substratreaktion. In Folge wurde die optische Dichte (OD) bei 450 nm mittels ELISA-Photometer (anthos hat III, anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland) zur Ermittlung der CRP-Konzentration abgelesen.

Endotoxinbestimmung in der Milch

Die Bestimmung des Gehaltes der Milch an Endotoxinen als Zellwandbestandteile Gram-negativer Bakterien wurde von der Fa. Biocheck GmbH (Leipzig, Deutschland) mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test vorgenommen. Durch dieses biologische Material des Pfeilschwanzkrebsses erfolgte die Aktivierung von vorhandenem Endotoxin in den Proben. Die Freisetzung von para-Nitroanilin aus

dem Substrat, welche von der Endotoxinkonzentration abhängig ist, wurde in definierten Intervallen bei 405 nm gemessen und mittels Software in Korrelation gebracht. Der Bereich von 0,005 bis 50 EU/ml ist hierbei linear. Um den strengen Vorgaben der Europäischen Pharmakopoe (EP) zur Durchführung des Assays zu entsprechen, wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung vorgenommen sowie eine Doppelbestimmung mit definierter Endotoxinmenge als interne Kontrolle vorgenommen. Bei exakt durchgeführter Positivkontrolle liegt dabei laut Europäischer Pharmakopoe ein valides Ergebnis vor.

Aufgrund des Kostenfaktors der Untersuchung wurden jedoch nicht alle Proben einzeln untersucht. Mit Hilfe der Zellzahlergebnisse der Viertelgemelke wurde eine Poolung der vier Proben eines Tieres zu jedem Zeitpunkt nach folgenden Zellzahlniveaus durchgeführt:

- < 50.000 Zellen/ml;
- > 50.000 bis 100.000 Zellen/ml;
- > 100.000 bis 500.000 Zellen/ml;
- > 500.000 bis 1.000.000 Zellen/ml;
- > 1.000.000 Zellen/ml.

3.4.5.2 Blutproben

Bestimmung spezifischer *E. coli*-Antikörper im Blutserum

Die quantitative Bestimmung der Antikörper IgG₁ und IgG₂ gegen LCV- bzw. SCV-*E. coli* verlief nach dem in 3.4.5.1.3 beschriebenen Prinzip eines ELISA mit den gleichen Arbeitsabläufen und wurde ebenso im Institut für Bakteriologie und Mykologie durchgeführt. Hierbei handelte es sich jedoch um einen indirekten ELISA, bei dem die Mikrotiterplatte mit 2 µg/ml Extraktantigenen nach in Kapitel 3.4.5.1.3 beschriebenem Prinzip beschichtet wurde.

Die Antigene wurden zuvor durch Kultivierung des Impfstammes von *E. coli* in Nährbouillon (SIFIN, Berlin, Deutschland) sowie Waschung und Aufnahme in Aqua bidest. gewonnen. Nach folgender 48-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde bei 2.200 g über 30 Minuten zentrifugiert und der entstandene klare und zellfreie Überstand als Extraktantigen für den ELISA verwendet. Die Verdünnung der Proben

auf 1:1.000 erfolgte mittels Pufferlösung aus PBST, 2 mM EDTA sowie 2 %iger Fischgelatine. Als laborinterner Standard wurde parallel stets dasselbe bovine Standardblutplasma (AK-Standard für das Rind, aliquotiert zu 1 ml) in verschiedenen Verdünnungen mitgeführt. Dieser Standard wurde auf 100 relative Einheiten (RE) pro ml laborintern definiert. Nach Inkubation und Waschen erfolgte die Zugabe von den 1:10.000 verdünnten HRP-Konjugatantikörpern IgG (Schaf)-anti-Rind-IgG₁ und -anti-Rind-IgG₂ (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, Texas, USA). Die Zugabe des bereits beschriebenen kolorimetrischen Substrates wurde nach Inkubation und Waschen der Platten vorgenommen. Bis zur Verwendung der Stopplösung (1 M H₂SO₄) wurde nochmals zehn Minuten lang inkubiert, und anschließend die optische Dichte gemessen und somit der Antikörpergehalt des Serums ermittelt.

Untersuchung von Haptoglobin im Serum

Auch die Untersuchung des Haptoglobingehaltes des Serums wurde im Institut für Bakteriologie und Mykologie vorgenommen. Die Arbeitsschritte des hierfür angewandten ELISA sind mit den in Kapitel 3.4.5.1.3 beschriebenen bis auf folgende Aspekte identisch: Die ELISA-Platte wurde mit 1:500 verdünntem IgG vom Kaninchen gegen humanes Haptoglobin (2 mg/ml, Fa. Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland) beschichtet. Die Serumproben wurden zudem auf 1:1.000 und der bovine Hp-Standard (0,771 mg/ml) auf bis zu 400 ng/ml verdünnt.

Ein weiterer Unterschied bestand in dem zur Verdünnung verwendeten Testpuffer, welcher 50 mM Tris-Salzsäure-Puffer mit einem pH von 8, 0,9 % Kochsalzlösung, 0,1 % Tween 20, 10 mM EDTA sowie 0,2 % bovines Casein enthielt.

3.4.6 Definition von Grenzwerten für den Euterviertelgesundheitsstatus

Die Auswertung von Zellzahlbefunden und bakteriologischer Untersuchung zur Ermittlung des Gesundheitsstatus der Euterviertel erfolgte gemäß den Leitlinien der DVG (2012) in Anlehnung an die IDF (1967). Dies konnte jedoch nur für die Zeitpunkte 1 und 3 vorgenommen werden, da zum Zeitpunkt 2 keine zytologischen Befunde erhoben wurden. Die Definitionen setzen das Fehlen klinischer Anzeichen einer Mastitis voraus.

- „*Eutergesund*“ sind Milchsekrete, die frei von Erregern sind und einen Grenzwert von 100.000 Zellen/ml nicht überschreiten.
- „*Latente Infektionen*“ beschreiben einen Keimnachweis bei einem Zellgehalt von unter 100.000 Zellen/ml.

- Bei „*unspezifischen Mastitiden*“ konnte kein Erregernachweis geführt werden, die somatischen Zellen in der Milch sind jedoch auf über 100.000 Zellen/ml erhöht.
- Eine „*subklinische Mastitis*“ liegt vor, wenn Mastitiserreger nachgewiesen werden konnten und die somatische Zellzahl höher als 100.000 Zellen/ml ist.

Da latente Infektionen nur schwer von Kontaminationen und Strichkanalbesiedlungen unterschieden werden können, wurde ein neuer Grenzwert festgelegt. Mit unter 50.000 Zellen/ml wurde bei Keimnachweis eine Kontamination vermutet und die Probe als „eutergesund“ gewertet, bei über 50.000 Zellen/ml eine „latente Infektion für möglich“ gehalten.

Für die statistische Auswertung erfolgte die Vergabe eines Scores.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">1: eutergesund2: latente Infektion möglich3: unspezifische Mastitis4: subklinische Mastitis5: Kontamination |
|---|

3.4.7 Auswirkung der Trockenstehperiode auf den Eutergesundheitsstatus

Des Weiteren wurde der zuvor ermittelte Euterviertelgesundheitsstatus zum Zeitpunkt 1 (zum Trockenstellen) mit dem des Zeitpunktes 3 (30 Tage p. p.) verglichen, um Veränderungen zu erkennen:

- „*Heilung*“: von subklinischer oder unspezifischer Mastitis bzw. latenter Infektion zu eutergesund
- „*Zellzahl sinkt*“: von subklinischer oder unspezifischer Mastitis zu einer möglichen latenten Infektion
- „*bleibende Infektion*“: subklinische oder unspezifische Mastitis bzw. latente Infektion bleibt bestehen
- „*Neuinfektion*“: von eutergesund zu subklinischer oder unspezifischer Mastitis bzw. latenter Infektion

Keine Berücksichtigung bei dieser Auswertung fanden Euterviertel, die eutergesund waren und blieben.

3.4.8 Milchleistungsprüfung (MLP)

Die MLP erfolgte im monatlichen Abstand durch den Landeskontrollverband Thüringen. Die Daten hinsichtlich der Zellzahl auf Gesamtgemelksebene der auf die Impfung folgenden Laktation kamen mit in die Auswertung. Verfolgt wurde die somatische Zellzahl ab dem zweiten Laktationsmonat bis zum erneuten Trockenstellen. Zum Vergleich fand auch die letzte Zellzahl der vorherigen Laktation vor dem Zeitpunkt 1 Verwendung.

3.4.9 Auftreten von klinischen Mastitiden

Die Dokumentation der Krankengeschichte im Herdeprogramm diene als Informationsquelle, um das Auftreten von klinischen Mastitiden vor Versuchsbeginn und in der auf den Versuch folgenden Laktation bewerten zu können.

3.5 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden in Tabellen des Statistikprogrammes IBM SPSS Statistics Version 20 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) für Windows 2000 erfasst und anschließend statistisch berechnet.

Zunächst wurden alle Daten mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Hier gab es deutliche Abweichungen bei den Werten von Zellzahl, Keimzahl, Endotoxin, CRP und spezifischen Antikörpern, so dass bei der deskriptiven Statistik der Medianwert, die Werte des ersten und dritten Quartils, sowie Minimal- und Maximalwerte Anwendung fanden, und meist eine graphische Darstellung in Boxplotdiagrammen (siehe Kapitel 3.5.1) erfolgte.

Die Prüfung auf statistische Unterschiede zwischen den Gruppen wurde bei Abweichung von der Normalverteilung mit dem nichtparametrischen U-Test nach Mann-Whitney vorgenommen. Zwischen den Zeitpunkten der Probenentnahme fand der Wilcoxon-Rang-Test Anwendung. Statistische Unterschiede wurden dann ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ ausgewiesen.

Zusammenhänge zwischen Parametern wurden mit der Pearson-Korrelationsanalyse überprüft.

3.5.1 Boxplotdiagramm

Das Boxplotdiagramm dient zur graphischen Darstellung der Verteilung von Daten, wobei verschiedene Streuungs- und Lagemaße zusammengefasst werden. Es soll

einen schnellen Eindruck übermitteln, in welchem Bereich die Daten liegen und wie sie sich in diesem verteilen (siehe Abbildung 3). Ein Boxplot besteht aus einem Rechteck, dessen Enden das erste und dritte Quartil der Daten kennzeichnen, die Länge der Box entspricht somit dem Interquartilabstand (interquartil range, IQR). In der sogenannten Box sind somit die mittleren 50 % der Daten abgebildet. Das erste Quartil entspricht den kleinsten 25 %, das dritte Quartil den kleinsten 75 % der Datenwerte. Ein Strich in der Box repräsentiert den Medianwert der Verteilung, bei dem 50 % der Werte kleiner oder gleich sind, während Linien, die durch einen Strich beendet werden, das Rechteck verlängern (sogenannte Whisker). Durch diese werden die außerhalb der Box liegenden Werte dargestellt. Bei der Erstellung von Boxplotdiagrammen im SPSS-Programm beschränkt sich die Abbildung der Whisker auf das 1,5-fache des Interquartilabstandes, wobei der Strich jedoch nicht genau auf dieser Länge, sondern beim letzten Wert, der sich noch in diesem Bereich befindet, endet. Sind keine Werte außerhalb des 1,5-fachen Interquartilabstandes vorhanden, kennzeichnet die Länge der Whisker den minimalen und maximalen Wert der Daten. Falls doch, erfolgt eine gesonderte Darstellung von Ausreißern (1,5- bis 3-faches des IQR) oder Extremwerten (mehr als 3-facher IQR). Innerhalb der Whisker liegen jedoch 95 % der Daten. Keine Berücksichtigung findet bei der Darstellung der Mittelwert der Daten, der im Allgemeinen den Durchschnitt bezeichnet und eine Annäherung an die zentrale Tendenz einer Normalverteilung angibt. Bei einer Schiefverteilung der Werte kann dies jedoch irreführend sein.

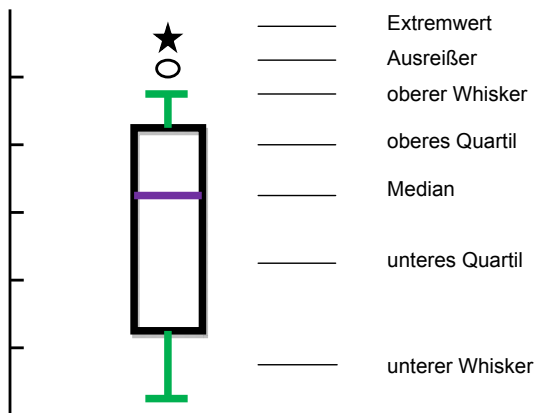


Abb.2: Das Boxplotdiagramm

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsablauf

Nicht alle 50 Tiere konnten im Versuchsablauf vollständig verfolgt werden. Aus Gruppe A schied ein Tier kurz nach der Abkalbung aus, da es aufgrund einer Geburtskomplikation verstarb. Auch in Gruppe C und in Gruppe D konnten bei je einem Tier keine Probennahme zu den Zeitpunkten 2 und 3 erfolgen, da bei den Kühen eine schwerwiegende Klauenerkrankung vorlag, die zum Abgang aus der Herde geführt hatte.

Des Weiteren gelang bei einigen Tieren aus den verschiedenen Gruppen die Überprüfung der Milchleistungsprüfungsdaten bis zum nächsten Trockenstellen nicht, da sie aus verschiedenen Gründen ebenso vorzeitig abgingen.

4.2 Klinische Untersuchung

Keines der ausgewählten Tiere zeigte zu den Zeitpunkten 1, 2 und 3 eine erkennbare Eutererkrankung oder ein gestörtes Allgemeinbefinden. Zudem waren zu keiner Zeit Impfreaktionen an den Applikationsstellen vorzufinden.

4.3 Untersuchung der Milchproben

4.3.1 Somatische Zellzahl der Milch

Die erste Zellzahlbestimmung in den Viertelgemelksproben zum Zeitpunkt des Trockenstellens (Versuchsbeginn) ergab signifikant unterschiedliche Werte zwischen der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Gruppen A, C und D ($p = 0,0001$ bis $0,04$). Lediglich die mediane Zellzahl der Gruppe B (185.000 Zellen/ml) lag auf ähnlich hohem Niveau wie das der Kontrollgruppe (263.000 Zellen/ml). Trotzdem ergab sich bei dieser Gruppe nur eine Signifikanz gegenüber den Gruppen A und C ($p = 0,001$ und $p = 0,018$), jedoch nicht Gruppe D. Die Proben der letztgenannten drei Gruppen unterschieden sich in der Höhe ihrer medianen somatischen Zellzahlen nur geringfügig (51.000, 67.000 und 110.000 Zellen/ml), was statistisch als nicht signifikant bewertet wurde.

Im Vergleich der Gruppen zum nächsten Zeitpunkt der Zellzahlbestimmung auf Viertelgemelksebene (Zeitpunkt 3; 30 Tage p. p.) waren die gleichen Verhältnisse wie zur ersten Probenentnahme zu beobachten, hier ergab sich jedoch zusätzlich ein

signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen B und D ($p = 0,022$). Wiederum lagen bei der Kontrollgruppe und der Gruppe B ähnliche Medianwerte vor (39.000 und 35.000 Zellen/ml), die sich von denen der Gruppen A (18.000 Zellen/ml), C (19.000 Zellen/ml) und D (20.000 Zellen/ml) unterschieden ($p = 0,003$ bis $0,05$).

Bei allen Gruppen lagen die Zellzahlwerte der Viertelgemelsproben zum Zeitpunkt 3 deutlich unter denen des Zeitpunktes 1 ($p = 0,0001$ bis $p = 0,015$).

Die Abbildung 3 erläutert die nachgewiesenen somatischen Zellzahlen.

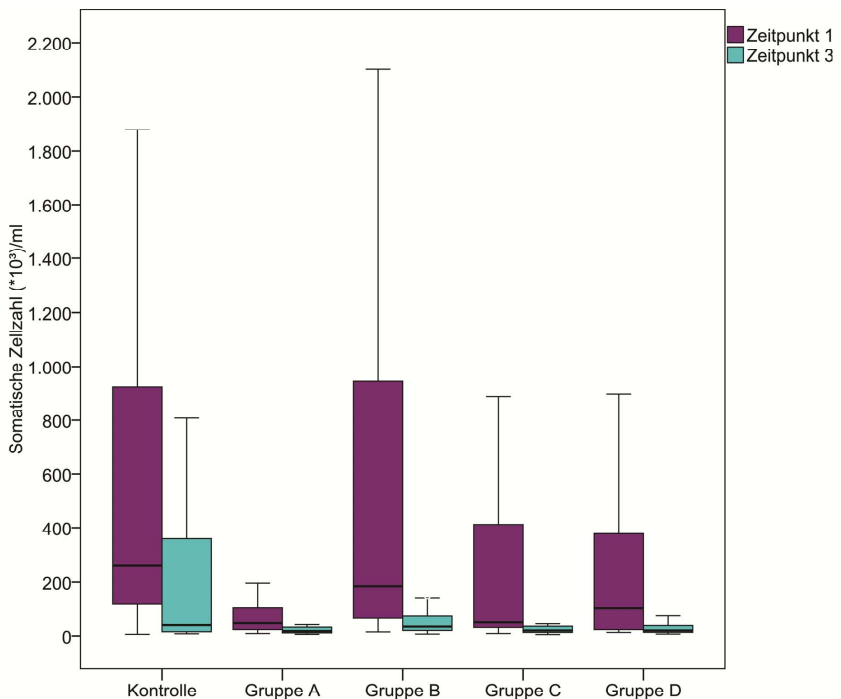


Abb. 3: Somatische Zellzahlen der Viertelgemelsproben im Gruppen- und Zeitpunktvvergleich: Darstellung der Zellzahl-niveaus der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3 (Medianwert, 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker; teilweise nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 1 des Anhangs)

4.3.2 Gesamtkeimzahl

Ein Keimnachweis erfolgte zum Zeitpunkt 1 in den Proben der Gruppe B ($n = 30$) am häufigsten, in denen der anderen Gruppen um mindestens ein Drittel seltener ($n = 11$ bis 20). Die Häufigkeiten der Erregerisolierungen minimierten sich zum Zeitpunkt 3 ($n = 3$ bis 6 bei Gruppen A, C, D; $n = 15$ bei der Kontrollgruppe), während wiederum 10 Proben der Gruppe B bakteriologisch positiv ausfielen.

Tab. 8: Häufigkeiten eines Keimnachweises (n); Gesamtkeimzahlen (in KBE/ml) der Viertelgemelksproben im Gruppen- und Zeitpunktvorgleich: (Medianwert, 1. und 3. Quartil; nicht aufgeführte Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 2 des Anhangs)

		Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3
Kontrolle	n	18	15
	Median	19750	23500
	1. - 3. Quartil	2950 - 832000	4550 - 270000
Gruppe A	n	20	3
	Median	1600	600
	1. - 3. Quartil	1000 - 6750	300 - 52000
Gruppe B	n	30	10
	Median	10000	14500
	1. - 3. Quartil	2000 - 40000	4250 - 65000
Gruppe C	n	16	5
	Median	15000	3000
	1. - 3. Quartil	2750 - 55000	1000 - 52500
Gruppe D	n	11	6
	Median	10000	3150
	1. - 3. Quartil	8000 - 20000	2425 - 5100

Die Auswertung der ermittelten Gesamtkeimzahlen wurde durch zum Teil hohe Maximalwerte erschwert. Zum Zeitpunkt 1 zeigte sich die Gruppe A mit signifikant niedrigerer Gesamtkeimzahl gegenüber den restlichen Versuchsgruppen ($p = 0,002$ bis $0,008$). Zum Zeitpunkt 3 gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen mit Ausnahme der Gruppe D gegenüber der Kontrolle ($p = 0,022$).

Ein gruppenweiser Vergleich der Zeitpunkte konnte aufgrund der geringen Anzahl an Daten nur in vier von fünf Gruppen vorgenommen werden, hierbei ergaben sich keine statistischen Relevanzen.

4.3.3 Erreger

4.3.3.1 Verteilung der Erreger

Das Erregerspektrum der bakteriologischen Untersuchungen der Milchproben zum Zeitpunkt 1 ist der Tabelle 9 bzw. das des Zeitpunktes 3 der Tabelle 10 zu entnehmen. Zu keiner Zeit erfolgte ein Nachweis von Hefen, Enterokokken oder Pseudomonaden. Zum Zeitpunkt 3 verliefen die bakteriologischen Untersuchungen in allen Gruppen häufiger negativ. Hervorzuheben sind hier besonders die Impfgruppen A, B und C.

Tab. 9: Verteilung der Erreger in den Viertelgemelksproben zum Zeitpunkt 1

	Kontrolle n (%)	Gruppe A n (%)	Gruppe B n (%)	Gruppe C n (%)	Gruppe D n (%)
kein Keimnachweis	22 (55)	20 (50)	10 (25)	21 (55,3)	29 (72,5)
sonstige	6 (15)	1 (2,5)	3 (7,5)	0 (0)	2 (5)
Corynebakterien	0 (0)	0 (0)	1 (2,5)	0 (0)	0 (0)
KNS	6 (15)	15 (37,5)	14 (35)	13 (34,2)	5 (12,5)
S. aureus	1 (2,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5)
Streptokokken	0 (0)	4 (10)	12 (30)	4 (10,5)	2 (5)
Coliforme	5 (12,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
nGesamt	40 (100)	40 (100)	40 (100)	38 (100)	40 (100)

Tab. 10: Verteilung der Erreger in den Viertelgemelksproben zum Zeitpunkt 3

	Kontrolle n (%)	Gruppe A n (%)	Gruppe B n (%)	Gruppe C n (%)	Gruppe D n (%)
kein Keimnachweis	25 (62,5)	32 (88,9)	29 (74,4)	31 (86,1)	30 (83,3)
sonstige	4 (10)	0 (0)	0 (0)	1 (2,8)	0 (0)
Corynebakterien	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
KNS	5 (12,5)	3 (8,3)	7 (17,9)	3 (8,3)	6 (16,7)
S. aureus	1 (2,5)	1 (2,8)	1 (2,6)	1 (2,8)	0 (0)
Streptokokken	0 (0)	0 (0)	2 (5,1)	0 (0)	0 (0)
Coliforme	5 (12,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
nGesamt	40 (100)	36 (100)	39 (100)	36 (100)	36 (100)

Eine Gegenüberstellung der bakteriologisch negativen und positiven Ergebnisse kann der Abbildung 4 entnommen werden.

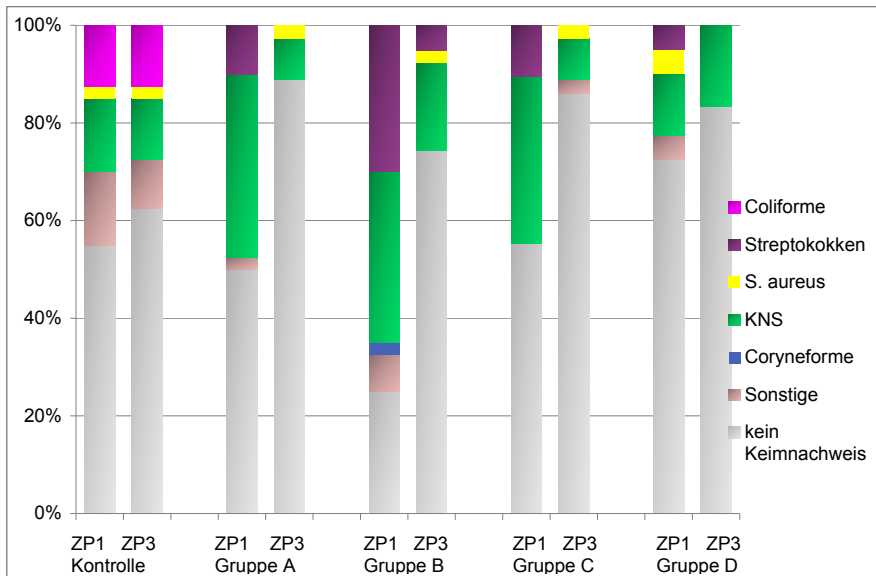


Abb. 4: Häufigkeiten der Keimnachweise in den Viertelgemelksproben zu den Zeitpunkten 1 und 3 (in Prozent)

4.3.3.2 Keim-Score

Nach Vergabe der Score-Werte der Keime konnte ein Vergleich der Pathogenität der Euterinfektionen durchgeführt werden.

Zum Zeitpunkt 1 konnten in der Gruppe B die meisten Mastitiserreger mit dem Medianwert 3 (= KNS) nachgewiesen werden. In den anderen Gruppen waren vorwiegend Proben ohne Keimnachweis und somit der Medianwert 0 zu verzeichnen. Hieraus ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe B und den restlichen vier Gruppen ($p = 0,0001$ bis $0,016$). Weiterhin waren in der Gruppe D neben zahlreichen keimfreien Milchproben hauptsächlich „sonstige Erreger“ nachweisbar, was jedoch lediglich einen signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe A ergab ($p = 0,048$).

Zum Zeitpunkt 3 wiesen die Euterviertel der Gruppe B im Median (= 0) ebenso viele Proben ohne Keimnachweis auf wie die der anderen Gruppen. Da in der

Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt Infektionen durch *E. coli* mit dem maximalen Score-Wert 9 auftraten, ergab sich eine statistische Relevanz im Vergleich zu den Score-Werten der Gruppen A, C und D ($p = 0,009$ bis $0,039$).

Eine von Zeitpunkt 1 auf 3 signifikant verminderte Nachweisrate an majorpathogenen Erregern wurde vor allem bei den Viertelgemelken der Gruppe B ($p = 0,0001$) sowie auch bei denen der Gruppen A ($p = 0,007$) und C ($p = 0,004$) ersichtlich.

Tab. 11: Score-Werte zur Pathogenität der bakteriologischen Nachweise der Viertelgemelksproben im Gruppen- und Zeitpunktvvergleich: (Medianwert, 1. und 3. Quartil; nicht aufgeführte Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 3 des Anhangs)

		Kontrolle	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Keim-Score Zeitpunkt 1	n	40	40	40	38	40
	Median	0	0,5	3	0	0
	1. - 3. Quartil	0 - 3	0 - 3	0,25 - 5	0 - 3	0 - 1
Keim-Score Zeitpunkt 3	n	40	36	39	36	36
	Median	0	0	0	0	0
	1. - 3. Quartil	0 - 3	0 - 0	0 - 3	0 - 0	0 - 0

4.3.4 CRP-Gehalt in der Milch

Zu Versuchsbeginn (Zeitpunkt 1) bestimmte CRP-Gehalte der Viertelgemelksproben unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Die Medianwerte lagen zwischen 390 und 520 ng/ml.

Bei der Ermittlung des CRP zum Zeitpunkt 2 (3 Tage post partum) ergaben sich signifikante Unterschiede bezüglich des Gruppenvergleichs, da die Medianwerte in Gruppe B und C (780 und 1096 ng/ml) erheblich von denen der Kontrollgruppe sowie der Gruppen A und D (600, 487 und 619 ng/ml) abwichen ($p = 0,001$ bis $0,015$).

30 Tage post partum (Zeitpunkt 3) waren diese Verhältnisse nicht mehr vorzufinden. Die Kontrollgruppe wies zum Zeitpunkt 3 den höchsten medianen CRP-Gehalt in der Milch auf (350ng/ml), der sich signifikant ($p = 0,01$ bis $0,049$) von denen der Gruppen A, B und D abhob (197, 230 und 223 ng/ml). Lediglich zur Gruppe C war mit $p = 0,056$ keine eindeutige Signifikanz nachweisbar. Die Impfgruppen unterschieden sich nicht voneinander.

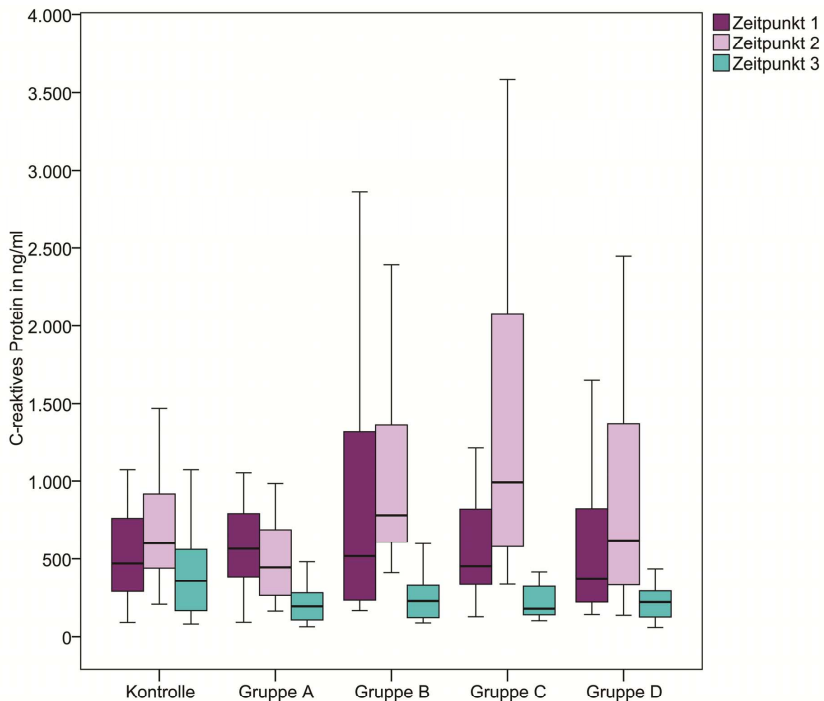


Abb. 5: CRP-Gehalt der Viertelgemelksproben im Gruppen- und Zeitpunktvvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3 (Medianwert, 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker; teilweise nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 4 des Anhangs)

Im gruppenweisen Vergleich der Entnahmen konnte bei allen Gruppen ein Anstieg der CRP-Werte von Zeitpunkt 1 auf Zeitpunkt 2 festgestellt werden, der sich jedoch nur bei den Gruppen K, C und D als signifikant darstellte ($p = 0,0001$ bis $0,027$). Zum Zeitpunkt 3 sanken die CRP-Gehalte bei allen Gruppen stark ab, was sich in einer deutlichen statistischen Relevanz gegenüber den Zeitpunkten 1 und 2 äußerte ($p = 0,0001$ bis $0,005$). In der Abbildung 5 sind die ermittelten CRP-Werte graphisch dargestellt.

4.3.4.1 Korrelation des CRP-Gehaltes in der Milch mit anderen Parametern

Hinsichtlich des Zusammenhanges der CRP-Konzentrationen mit der Zellzahl als etabliertem Wert ergab sich zum Zeitpunkt 1 der Bestimmungen insgesamt eine geringgradige positive Korrelation (Koeffizient 0,480) bei der Analyse nach Pearson. Der Zusammenhang wurde in den Gruppen B (0,775), C (0,555) und D (0,536) ersichtlich, während sich in der Kontrollgruppe und der Gruppe A keine positive Korrelation ergab.

Zum Zeitpunkt 3 wurde eine insgesamt eine weniger deutliche positive Korrelation zum Parameter Zellzahl (Koeffizient 0,208) gefunden. Dieser Zusammenhang konnte nur in den Gruppen B (0,466) und D (0,418) dargestellt werden.

Zu anderen Parametern bestand keine Korrelation.

4.3.5 Endotoxingehalt in der Milch

Die Ergebnisse der Untersuchungen auf Endotoxin in den Viertelgemelksproben erbrachten eine deutliche Schiefverteilung der Werte mit teilweise extremen Maxima, welche in der Anlage 4 des Anhangs dargestellt sind. Einen Überblick über die Daten gibt die Tabelle 12.

Zum Zeitpunkt 1 (zum Trockenstellen) konnten erhebliche Unterschiede in den Endotoxinkonzentrationen der Kontrollgruppe gegenüber denen der Gruppen A, B und C festgestellt werden ($p = 0,0001$ bis $0,001$). Eine Ausnahme bildete Gruppe D mit $p = 0,10$, in der hohe Werte nachzuweisen waren. Dies erklärt wiederum den signifikanten Unterschied der Gruppe D zu den Gruppen A und B.

Zum Zeitpunkt 2 (3 Tage post partum) war ein Anstieg der Werte aller Gruppen, besonders jedoch der Gruppe B zu verzeichnen. Die Endotoxinkonzentrationen in den Milchproben des Zeitpunktes 2 zeigten sich signifikant höher als die der Kontrollgruppe und der Gruppen A und D ($p = 0,008$ bis $0,013$), während zwischen den anderen Gruppen kein statistisch relevanter Unterschied zu erkennen war.

Zum Zeitpunkt 3 (30 Tage post partum) ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen an Endotoxin der Kontrollgruppe und der Gruppe C ($p = 0,044$) sowie zwischen denen der Gruppe A und der Gruppe C ($p = 0,014$) und zwischen denen der Gruppe A und der Gruppe D ($p = 0,029$). Weitere signifikante Verhältnisse konnten nicht festgestellt werden.

Tab. 12: Deskriptive Statistik zum Endotoxingehalt (EU/ml) der Milch in Viertelgemelksproben der Versuchstiere der 5 Gruppen zu den Probennahmezeitpunkten 1, 2 und 3 (Medianwert, 1. und 3. Quartil; nicht aufgeführte Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 5 des Anhangs)

		Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3
Kontrolle	n	40	40	40
	Median	50	50	50
	1. - 3. Quartil	50 - 50	50 - 458	50 - 1427
Gruppe A	n	40	40	36
	Median	10	255	552
	1. - 3. Quartil	5 - 45	62 - 495	47 - 11171
Gruppe B	n	40	40	40
	Median	6	1770	120
	1. - 3. Quartil	5 - 24	162 - 18880	43 - 1511
Gruppe C	n	40	36	36
	Median	30	449	61
	1. - 3. Quartil	5 - 344	41 - 3121	40 - 257
Gruppe D	n	40	36	35
	Median	31	152	75
	1. - 3. Quartil	8 - 18578	56 - 1145	44 - 153

Im Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Kontrollgruppe konnte ein deutlicher Anstieg der Endotoxinkonzentrationen zum Zeitpunkt 2 und 3 von Zeitpunkt 1 ausgehend nachgewiesen werden ($p = 0,001$). Die Werte der zweiten und dritten Probennahme unterschieden sich nicht.

Für die Gruppe A konnte ein tendenziell steigender Gehalt an Endotoxin in der Milch festgestellt werden. Die Werte der drei verschiedenen Zeitpunkte sind signifikant unterschiedlich ($p = 0,0001$ bis $0,012$).

Bei den Tieren der Gruppe B war zum Zeitpunkt 1 ein signifikant niedrigerer Endotoxingehalt der Proben als zum Zeitpunkt 2 und 3 nachzuweisen ($p = 0,0001$). Die Werte der letzten beiden Probennahmen unterschieden sich nicht.

Bei den Gruppen C und D konnte lediglich eine signifikant niedrigere Konzentration an Endotoxin von Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 3 statistisch belegt werden ($p = 0,018$ und $p = 0,002$). Die Werte der Zeitpunkte 2 und 3 unterschieden sich jedoch nicht deutlich von denen des Zeitpunktes 1.

4.4 Untersuchung der Blutserumproben

4.4.1 Spezifische Antikörper im Blutserum

4.4.1.1 IgG₁-anti-LCV-*E. coli*

Die Abbildung 6 stellt die zu den Zeitpunkten 1 und 3 nachgewiesenen Gehalte des Serums der Versuchstiere an spezifischen Antikörpern IgG₁ gegen LCV-*E. coli* dar.

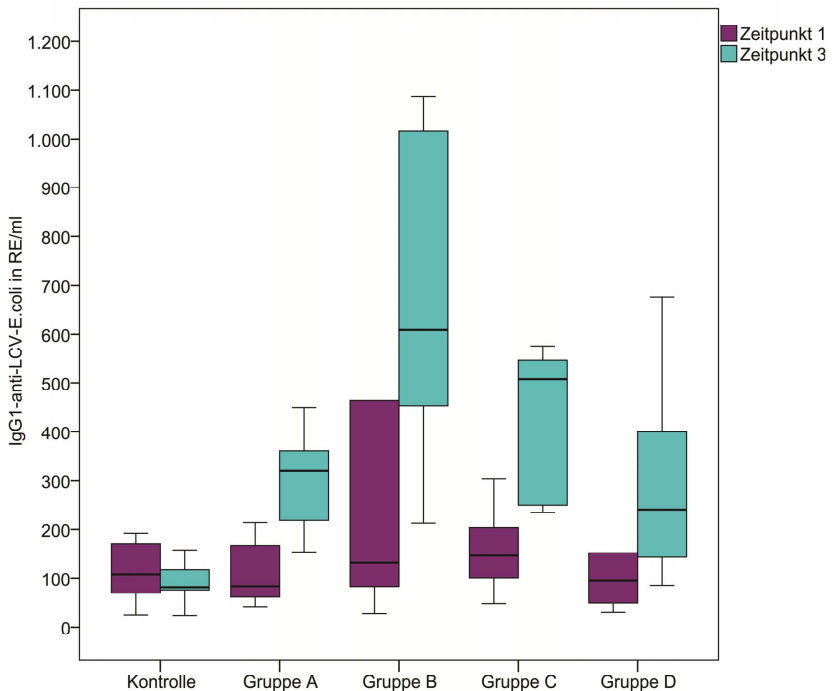


Abb. 6: Serumgehalt an IgG₁ gegen LCV-*E. coli* im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3 (Medianwert, 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker; teilweise nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 6 des Anhangs)

Zu Versuchbeginn (Zeitpunkt 1) wiesen alle Gruppen ähnliche Werte auf (73,1 bis 134,1 RE/ml als Medianwert), die sich statistisch nicht voneinander unterschieden ($p > 0,15$). Zum Zeitpunkt 3 (30 Tage post partum) lag das Niveau der Werte der Kontrollgruppe (Medianwert 81,6 RE/ml) signifikant ($p = 0,0001$ bis $0,009$) unter dem

der Impfgruppen (Medianwerte 240,7 bis 608,9 RE/ml). Der mengenmäßig höchste Nachweis der IgG₁-anti-LCV-*E. coli* erfolgte in der Gruppe B, was gegenüber den Gruppen A und D signifikant höher war ($p = 0,009$), jedoch nicht gegenüber Gruppe C. Zwischen den Gruppen A, C und D gab es keine statistisch relevanten Unterschiede.

Im Vergleich der Probennahmezeitpunkte je Gruppe konnte eine signifikante Erhöhung des Serumgehaltes an IgG₁-anti-LCV-*E. coli* innerhalb der Gruppen A, C und D festgestellt werden ($p = 0,008$). Dieser Anstieg der Werte war auch bei den Tieren der Gruppe B zu beobachten, eine statistische Relevanz lag jedoch nicht vor ($p = 0,093$). Bei der Kontrollgruppe waren tendenziell eher weniger spezifische Antikörper nachweisbar ($p = 0,093$).

4.4.1.2 IgG₁-anti-SCV-*E. coli*

Auch die zu Versuchsbeginn ermittelten Gehalte des Serums an spezifischen Antikörpern IgG₁-anti-SCV-*E. coli* unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen (Medianwerte 76,8 bis 127,3 RE/ml; $p > 0,16$). Zum Zeitpunkt 3 waren die Werte der Impfgruppen, jedoch nicht der Kontrollgruppe, deutlich angestiegen (Medianwerte 173 bis 568,5 RE/ml). Dies äußerte sich in einer deutlichen Signifikanz der Gruppen A, B und C gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,0001$ bis $0,003$). Für Gruppe D wurde p lediglich als 0,06 ermittelt.

Innerhalb der Impfgruppen ergaben sich lediglich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe B und den Gruppen A und D ($p = 0,027$ und $p = 0,006$), da bei den Tieren der erstgenannten Gruppe die höchsten Gehalte an IgG₁-anti-SCV-*E. coli* nachgewiesen werden konnten.

Der Anstieg der Serumwerte von Zeitpunkt 1 auf Zeitpunkt 3 erwies sich bei den Gruppen A, C und D als statistisch relevant ($p = 0,008$), bei der Gruppe B konnte trotz der höchsten gemessenen Werte p nur als 0,074 ermittelt werden. Für die Kontrollgruppe ergab sich kein Unterschied zwischen Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 3.

Die nachgewiesenen Gehalte des Serums der Versuchstiere sind der Abbildung 7 zu entnehmen.

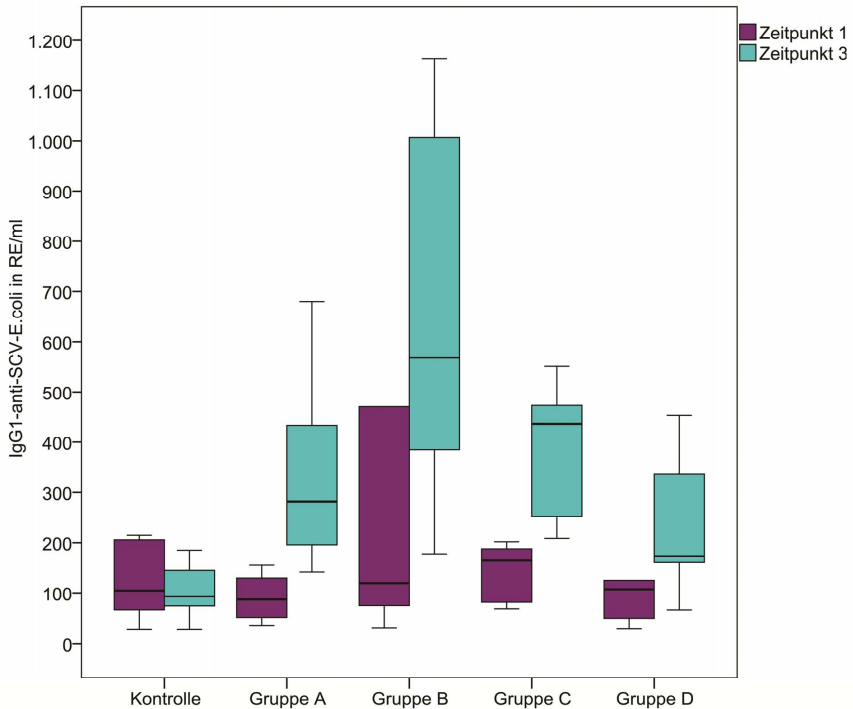


Abb. 7: Serumgehalt an IgG₁ gegen SCV-*E. coli* im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3 (Medianwert, 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker; teilweise nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 7 des Anhangs)

4.4.1.3 IgG₂-anti-LCV-*E. coli*

Die Abbildung 8 beschreibt die in den Untersuchungen ermittelten Gehalte des Serums der Versuchstiere an IgG₂ gegen LCV-*E. coli*.

Zur Probenentnahme zum Versuchsbeginn (Zeitpunkt 1; zum Trockenstellen) wiesen die Tiere der verschiedenen Gruppen ähnliche Serumgehalte an spezifischen Antikörpern IgG₂ gegen LCV-*E. coli* auf (Medianwerte 22,7 bis 70,6 RE/ml; $p > 0,10$). Zum Zeitpunkt 3 (30 Tage post partum) stiegen die Werte der Impfgruppen (Medianwerte 80,3 bis 195,8 RE/ml) signifikant über die der Kontrollgruppe (32,9 RE/ml) an ($p = 0,001$ bis $0,034$). Eine Ausnahme bildete die Gruppe D mit $p = 0,06$.

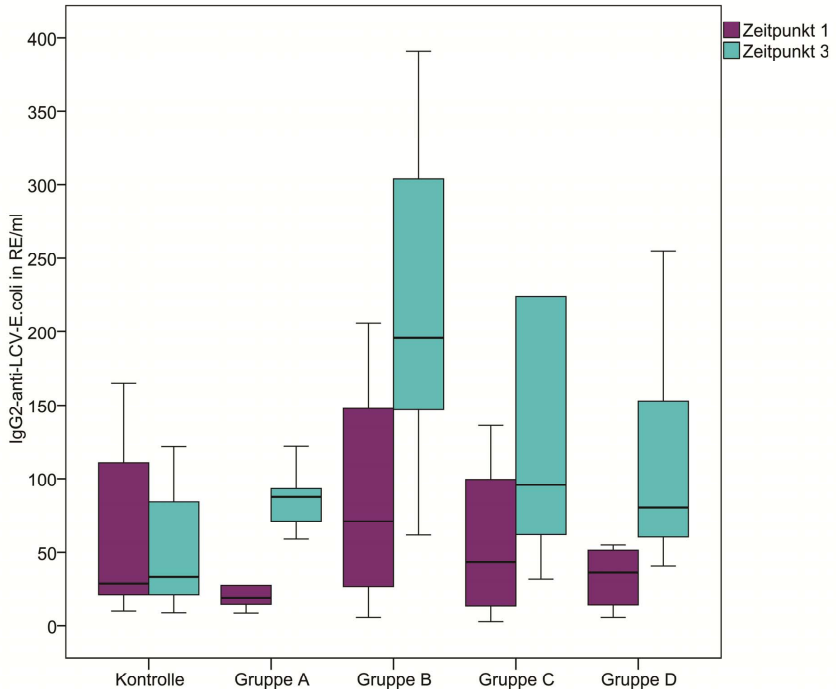


Abb. 8: Serumgehalt an IgG₂ gegen LCV-*E. coli* im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3 (Medianwert, 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker; teilweise nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 8 des Anhangs)

Die höchsten IgG₂-Gehalte erreichten die Tiere der Gruppe B, was statistisch signifikant über denen der Gruppen A und D lag ($p = 0,009$ und $p = 0,022$).

Im Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Gruppen ergab sich bei den Gruppen A, C und D ein signifikanter Anstieg des Antikörpergehaltes ($p = 0,008$ bis $0,028$), während dieser bei den Kontrolltieren gleichbleibend war ($p = 1,000$). Auch bei den Kühen der Gruppe B stiegen die Werte deutlich, was jedoch statistisch als nicht signifikant resultierte ($p = 0,074$).

4.4.1.4 IgG₂-anti-SCV-*E. coli*

Die Serumgehalte der Tiere an IgG₂ gegen SCV-*E. coli* zeigten ein ähnliches Verhalten wie die vorher beschriebenen spezifischen Antikörper. Die Abbildung 9 unterstreicht dies.

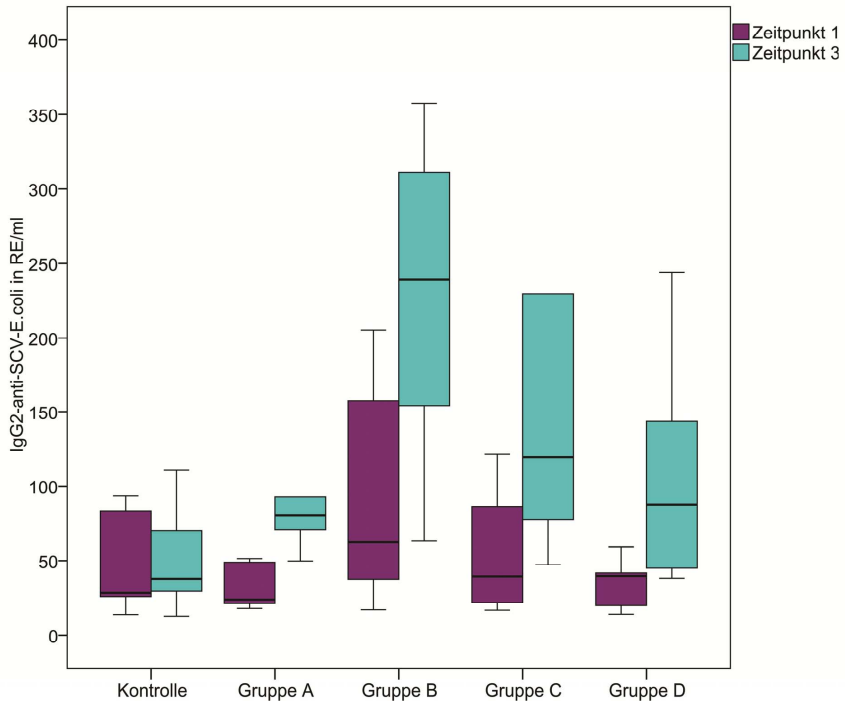


Abb. 9: Serumgehalt an IgG₂ gegen SCV-*E. coli* im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zu den Entnahmezeitpunkten 1 und 3 (Medianwert, 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker; teilweise nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 9 des Anhangs)

Zu Versuchsbeginn unterschieden sich die Antikörpergehalte hinsichtlich IgG₂-anti-SCV-*E. coli* zwischen den Gruppen kaum (Medianwerte zwischen 26,6 und 62,3 RE/ml; $p > 0,11$). Lediglich Gruppe B und D waren schwach signifikant verschieden ($p = 0,049$). Zum Zeitpunkt 3 stiegen die Werte der Impfgruppen (Medianwerte 80,5 bis 239,2 RE/ml) deutlich ($p = 0,001$ bis $0,022$) über das der Kontrollgruppe

(Medianwert 37,6 RE/ml). Gruppe B lag noch einmal signifikant über dem erreichten Niveau der Gruppen A und D ($p = 0,014$).

Die Gruppen A, C und D erreichten im Gegensatz zur Kontrollgruppe einen signifikant erhöhten Antikörperspiegel im Vergleich zur ersten Beprobung ($p = 0,008$ bis $p = 0,011$), während bei den Tieren der Gruppe B eine statistisch nur wenig relevante Erhöhung zu beobachten war ($p = 0,074$).

4.4.2 Haptoglobin im Serum

Die Ergebnisse der Haptoglobinbestimmungen zeigten keinen statistischen Zusammenhang im Zeitpunkt- oder Gruppenvergleich, da für die Impfgruppen zu beiden Zeitpunkten lediglich ein Median der Werte von 0,01 mg/ml bzw. für die Kontrollgruppe 0,175 mg/ml (Zeitpunkt 1) und 0,004 mg/ml (Zeitpunkt 3) an Haptoglobin im Serum, welches Werte nahe der unteren Nachweisgrenze sind, erreicht wurden.

Zum Zeitpunkt 1 zeigte lediglich eines von 50 Tieren einen erhöhten Hp-Wert (4,96 mg/ml, Tier 5 der Gruppe B). Zum Zeitpunkt 3 galt dies für insgesamt 4 Tiere (10,049 mg/ml, Tier 6 der Kontrollgruppe; 1,512 mg/ml, Tier 9 der Kontrollgruppe; 566,63 mg/ml, Tier 4 der Gruppe A; 20,65 mg/ml, Tier 6 der Gruppe B; siehe auch Anlage 10 des Anhangs).

4.5 Eutergesundheitsstatus

Zum Zeitpunkt 1 waren im Gruppenvergleich der Kontrollgruppe und der Gruppe B weniger gesunde und mehr subklinisch erkrankte Euterviertel zuzuordnen, während unter den Gruppen A, C und D kaum ein Unterschied in der Anzahl der gesunden und kranken Viertel feststellbar war.

Zum Zeitpunkt 3 befanden sich in der Kontrollgruppe die wenigsten gesunden und die meisten subklinisch erkrankten Euterviertel, während sich der allgemeine Eutergesundheitsstatus der Impfgruppen als sehr ähnlich erwies.

Nach Vergabe der Score-Werte (siehe Tab. 14) konnte eine statistische Auswertung erfolgen. Es ergaben sich Unterschiede in den einzelnen Gruppen. Zum Zeitpunkt 1 lag der mediane Score-Wert in der Kontrollgruppe und der Gruppe B besonders hoch, so dass von wenig eutergesunden Tieren ausgegangen werden konnte. Ein signifikanter Unterschied des Eutergesundheitsstatus dieser Kühe war im Vergleich zu dem der Tiere der Gruppen A, C und D zu beobachten ($p = 0,004$ bis $0,023$).

Eine Ausnahme bildete der Vergleich der Kontrolle mit der Gruppe C, wobei kein deutlicher Unterschied erkennbar war ($p = 0,084$).

Zum Zeitpunkt 3 waren bei allen vier geimpften Gruppen (A bis D) ähnliche Score-Werte und somit in etwa gleich viele gesunde Euterviertel nachzuweisen. Bei den Tieren der Gruppen A, C und D ergab sich erneut ein statistisch signifikant besserer Eutergesundheitsstatus als bei den Tieren der Kontrollgruppe ($p = 0,003$ bis $0,021$).

Bei allen Gruppen verbesserte sich der Eutergesundheitsstatus signifikant zum Zeitpunkt 3 ($p = 0,0001$ bis $0,029$), wobei der Unterschied zwischen Zeitpunkt 1 und 3 bei der Gruppe B am relevantesten war ($p = 0,0001$).

Tab. 13: Eutergesundheitsstatus auf Viertelebene

	Zeitpunkt	eutergesund	latente Infektion möglich	unspezif. Mastitis	subklin. Mastitis	n _{gesamt}
Kontrolle	1 3	9 21	0 7	13 4	17 8	39 40
Gruppe A	1 3	19 31	7 0	1 1	13 4	40 36
Gruppe B	1 3	8 27	6 5	2 2	24 6	40 40
Gruppe C	1 3	18 29	3 1	3 2	14 4	38 36
Gruppe D	1 3	19 30	1 2	10 0	10 3	40 35

Tab. 14: Deskriptive Statistik der Score-Werte zum Eutergesundheitsstatus zum Zeitpunkt 1 und 3 (Median, 1. und 3. Quartil; Minima und Maxima sowie Signifikanzprüfung in Anlage 11 des Anhangs)

		Kontrolle	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
Zeitpunkt 1	n	39	40	40	38	40
	Median	3	2	4	2	2,5
	1. - 3. Quartil	3 - 4	1 - 4	2 - 4	1 - 4	1 - 3,75
Zeitpunkt 3	n	40	36	40	36	35
	Median	1	1	1	1	1
	1. - 3. Quartil	1 - 3	1 - 1	1 - 2	1 - 1	1 - 1

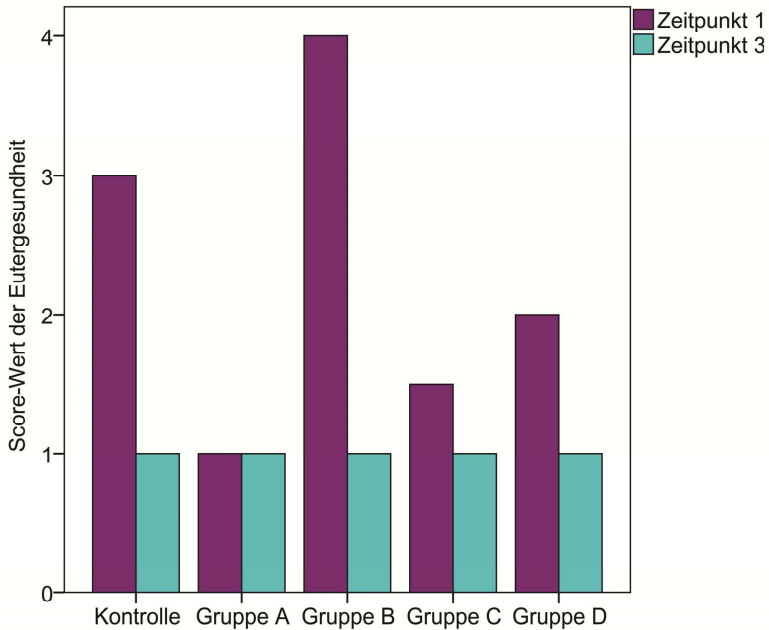


Abb. 10: mediane Score-Werte der Eutergesundheit zu den Zeitpunkten 1 und 3

4.6 Auswirkungen der Trockenstehperiode auf den Eutergesundheitsstatus

Auf Viertelebene konnte über die Trockenstehperiode eine Ausheilung bestehender Infektionen in insgesamt 77 Eutervierteln verzeichnet werden. Hierbei gehörten signifikant mehr Viertel zu Tieren der Gruppe A ($p = 0,016$) und der Gruppe D ($p = 0,011$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Tab. 15). Zwischen den Impfgruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Auf Kuhebene war bei keinem der Kontrolltiere eine vollständige Ausheilung bestehender Euterinfektionen nachzuweisen, in den Impfgruppen konnten jedoch einige Tiere zum Zeitpunkt 3 (30 Tage post partum) als vollständig ausgeheilt betrachtet werden (siehe Tab. 16).

Tab. 15: Änderung des Eutergesundheitsstatus in der Trockenstehperiode

	Heilung n (%)	SCC sinkt n (%)	Infektion bleibt n (%)	Neuinfektion n (%)	n _{gesamt} (%)
Kontrolle	13 (40,6)	7 (21,9)	10 (31,3)	2 (6,3)	32 (100)
Gruppe A	15 (75)	0 (0)	2 (10)	3 (15)	20 (100)
Gruppe B	20 (60,6)	4 (12,1)	8 (24,2)	1 (3)	33 (100)
Gruppe C	13 (65)	1 (5)	3 (15)	3 (15)	20 (100)
Gruppe D	16 (76,2)	0 (0)	2 (9,5)	3 (14,3)	21 (100)
n _{gesamt} (%)	77 (61,1)	12 (9,5)	25 (19,8)	12 (9,5)	126 (100)

Auf Kuhebene war bei keinem der Kontrolltiere eine vollständige Ausheilung bestehender Euterinfektionen nachzuweisen, in den Impfgruppen konnten jedoch einige Tiere zum Zeitpunkt 3 (30 Tage post partum) als vollständig ausgeheilt betrachtet werden (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Heilung auf Tierebene

	Kontrolle	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
n _{gesamt}	10	9	10	9	9
n _{geheilt}	0	4	2	3	4

4.7 Auswertung der MLP-Daten

4.7.1 Laktationsverlauf

Eine statistische Auswertung wurde exemplarisch für die Hochlaktation anhand der Werte des zweiten und vierten Laktationsmonats durchgeführt. Dargestellt ist dieser Vergleich in der Abbildung 12.

Bei der Auswertung der Zellzahlen der Milchleistungsprüfung im zweiten Laktationsmonat ergaben sich kaum statistisch relevante Unterschiede. Lediglich die Werte der Tiere der Gruppe C (Median 27.000 Zellen/ml) lagen signifikant unter denen der Gruppe B (60.500 Zellen/ml; $p = 0,050$) sowie unter denen der Kontrollgruppe (134.000 Zellen/ml; $p = 0,020$).

Im vierten Laktationsmonat war auch dieser Unterschied zwischen den Gruppen nicht erheblich und der Median der Werte lag bei allen fünf Gruppen auf ähnlich hohem Niveau.

Eine Veränderung des Zellzahlgehaltes vom zweiten auf den vierten Laktationsmonat war nur in der Gruppe C erkennbar, hier stiegen die Werte signifikant ($p = 0,033$) an.

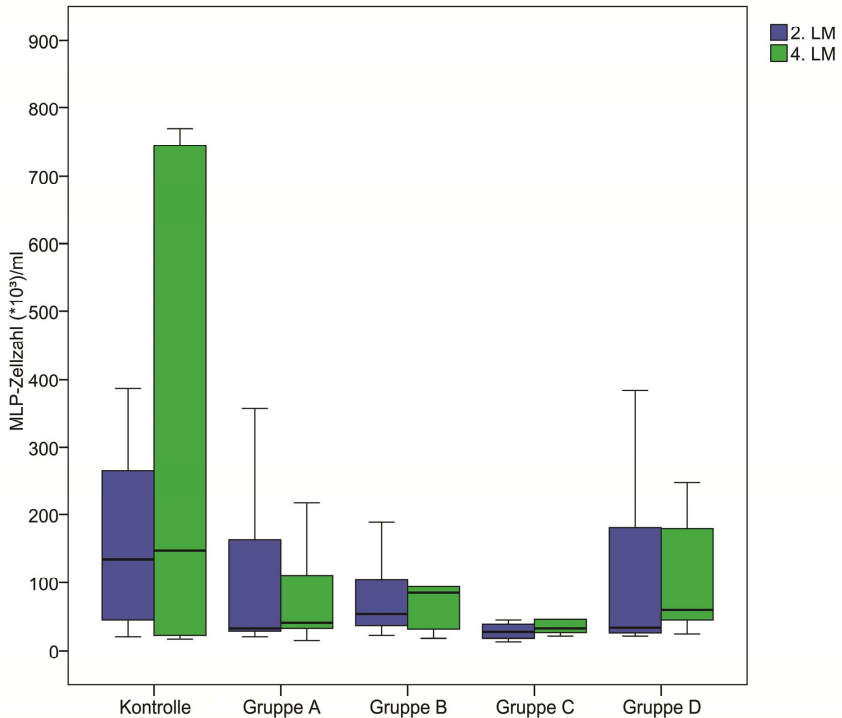


Abb. 11: Zellgehalte des Gesamtgemels laut Milchleistungsprüfungsdaten im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen im 2. Laktationsmonat (2. LM) und im 4. Laktationsmonat (4. LM) nach Versuchsende (Medianwert, 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker; teilweise nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 12 des Anhangs)

Die Abbildung 12 gibt einen Überblick über den Verlauf der Zellgehalte der Gesamtgemelke laut Milchleistungsprüfungen der Laktationsmonate 2 bis 12. Die Kurven der Gruppen A und C liegen deutlich unter denen der Gruppen B und D und der Kontrolle.

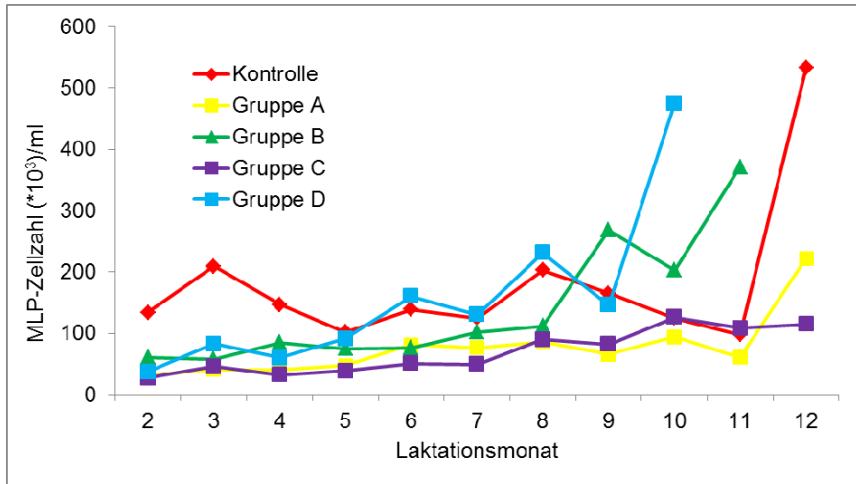


Abb. 12: Zellgehalte des Gesamtgemels laut Milchleistungsprüfungsdaten im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Medianwerte der 5 Gruppen in den einzelnen Laktationsmonaten (2. LM bis maximal 12. LM) nach Versuchsende (Darstellung der Medianwerte; 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker sowie nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 13 des Anhangs)

4.7.2 Vergleich der MLP-Daten vor dem Trockenstellen

Vor dem Trockenstellen zu Versuchbeginn unterschieden sich die Zellzahlen der Gesamtgemelke der Kontrollgruppe (Medianwert 381.000 Zellen/ml) in der Milchleistungsprüfung signifikant ($p = 0,0001$ bis $0,006$) von denen der Impfgruppen (Medianwerte zwischen 88.000 und 142.000 Zellen/ml).

Zum Trockenstellen nach Versuchsende konnte zwischen den Gruppen kein Unterschied festgestellt werden, da die Zellzahlen der Kontrollgruppentiere gesunken (Medianwert 98.000 Zellen/ml) und die der Impftiere gestiegen waren (Medianwerte zwischen 151.000 und 268.000 Zellen/ml). Beim gruppenweisen Vergleich der Zeitpunkte ergab sich jedoch nur bei der Gruppe B ein signifikanter Anstieg der Zellzahl ($p = 0,050$).

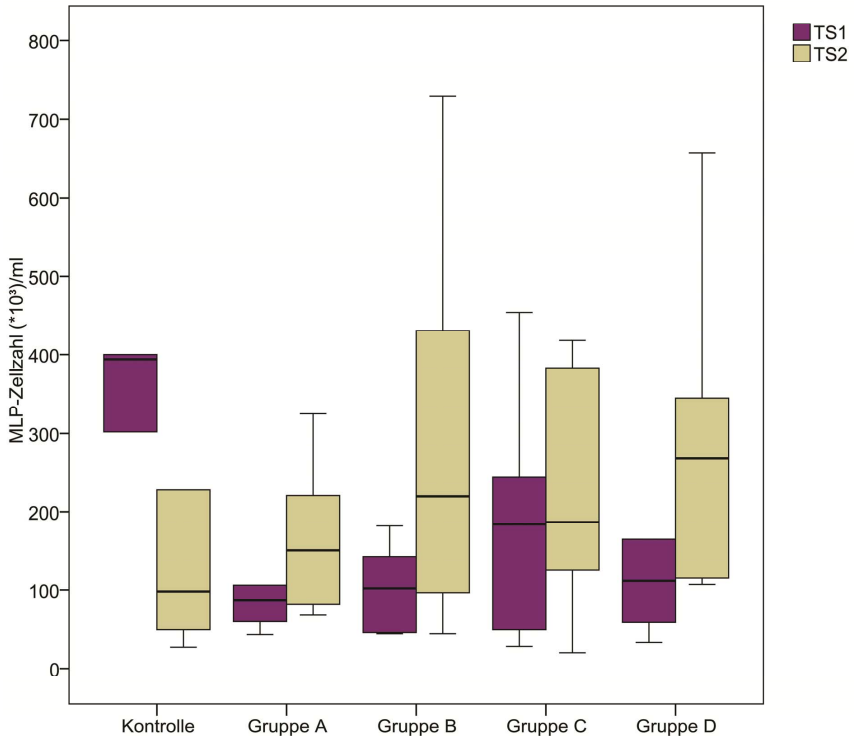


Abb. 13: Zellgehalte des Gesamtgemels laut Milchleistungsprüfungsdaten im Zeitpunkt- und Gruppenvergleich: Darstellung der Werte der 5 Gruppen zum Trockenstellen 1 (TS 1) zu Versuchsbeginn und zum nächsten Trockenstellen (TS 2) nach Versuchsende (Medianwert, 1. und 3. Quartil, oberer und unterer Whisker; teilweise nicht abgebildete Minimal- und Maximalwerte des Datensatzes in Anlage 14 des Anhangs)

4.8 Auftreten von klinischen Mastitiden

Anhand der geringen Menge an vorhandenen Daten konnte kein statistischer Vergleich der Mastitishäufigkeiten vor bzw. nach dem Versuch vorgenommen werden. Bei Betrachtung des Parameters des Vorkommens einer klinischen Mastitis ist ein vermehrtes Auftreten in der auf den Versuch folgenden Laktation bei den Kontrolltieren zu vermuten (siehe Tab. 17).

Tab. 17: Vorkommen einer klinischen Mastitis vor Versuchsbeginn und in der Folgelaktation

		keine Mastitis vor TS1 / vor TS2	klinische Mastitis vor TS1 / vor TS2	Colimastitis vor TS1 / vor TS2	n _{gesamt} vor TS1 / vor TS2
Kontrolle	n	40 / 24	0 / 15	0 / 1	40 / 40
	%	100 / 60	0 / 37,5	0 / 2,5	100 / 100
Gruppe A	n	35 / 32	2 / 2	3 / 2	40 / 36
	%	87,5 / 88,9	5 / 5,6	7,5 / 5,6	100 / 100
Gruppe B	n	34 / 36	5 / 3	1 / 1	40 / 40
	%	85 / 90	12,5 / 7,5	2,5 / 2,5	100 / 100
Gruppe C	n	34 / 30	5 / 4	1 / 2	40 / 36
	%	85 / 83,3	12,5 / 11,1	2,5 / 5,6	100 / 100
Gruppe D	n	32 / 28	3 / 7	5 / 1	40 / 36
	%	80 / 77,8	7,5 / 19,4	12,5 / 2,8	100 / 100

5 Diskussion

5.1 Ziel der Arbeit

Bisher liegen kaum Untersuchungsergebnisse zur Anwendung von bestandsspezifischen *E. coli*-Vakzinen vor, die durch Steigerung der Immunabwehr potentiellen Schutz vor Euterinfektionen bieten sollen. Ziel der Arbeit war, die Wirkung von *large* sowie *small colony variants* eines *E. coli*-Isolates des Bestandes als Rein- und Mischvakzine sowie unter Verwendung eines spezifischen Adjuvants in der Mischvakzine zur Prophylaxe umweltbedingter klinischer als auch subklinischer Mastitiden zu testen und somit möglicherweise den Eutergesundheitsstatus im peripartalen Zeitraum sowie im Laktationsverlauf zu verbessern. Eine große Rolle spielt hierbei die Neutralisierung von freien Endotoxinen durch spezifische Antikörper im peripartalen Zeitraum.

5.2 Kritische Betrachtungen der Methoden

5.2.1 Auswahl des Projektbetriebes

Der Versuchsaufbau mit der Maßgabe der Verabreichung verschiedener Impfstoffe erforderte eine Vielzahl von trockenzustellenden Tieren, die in der benötigten Menge nur in einer großen Herde vorzufinden waren. Auch die vorgegebenen, individuell schwankenden Impf- und Probenentnahmezeitpunkte beeinflussten die Auswahl des Projektbetriebes stark, da dies sowohl ein gutes Management als auch eine verlässliche Mitarbeit erforderte. Die tierärztlich geführte Milchviehanlage in Schwabhausen erschien somit seitens der Rahmenbedingungen ideal. In diesem Betrieb treten jedoch klinische Mastitiden im Allgemeinen nur sporadisch auf, so dass keines der Versuchstiere eine schwerwiegende klinische Mastitis im Beprobungszeitraum entwickelte und somit keine Beweisführung hinsichtlich der Senkung derer Inzidenz oder Schwere vorgenommen werden konnte. Die Untersuchungen mussten sich somit auf den Einfluss der Vakzine auf das Immunsystem und den Eutergesundheitsstatus beschränken. Die Auswertung des Vorkommens klinischer Eutererkrankungen erfolgte lediglich anhand der Aufzeichnungen zu den Tieren vor bzw. nach dem Versuch.

5.2.2 Impfreime

Die Anwendung der Impfstoffe erfolgte in Anlehnung an die Impfschemata von J5-Vakzinen zu drei Zeitpunkten während des Peripartums, da dies von WILSON und GONZÁLEZ (2003) nach Auswertung verschiedener Studien als wirkungsvollste Methode angesehen wurde. Neuere Untersuchungen zeigten den positiven Effekt zusätzlicher Impfungen nach kurzer Zeit (ERSKINE et al. 2007 und 2010), was jedoch im Projekt nicht vorgesehen war.

Im Unterschied zu WILSON und GONZÁLEZ (2003) die Impfung zum Trockenstellen, vier Wochen später sowie etwa eine Woche nach der Abkalbung durchzuführen, wurde sich zur Impfung acht und fünf Wochen vor dem errechneten Geburtstermin sowie exakt drei Tage nach der Abkalbung entschieden. Die Immunisierung über die Trockenstehperiode wurde zur Kondition, da über diesen Zeitraum eine labile Abwehrsituation bei Milchkühen besteht (DVG 2012) und viele klinische Mastitisfälle in der Frühlaktation auf Infektionen während des Trockenstehens zurückzuführen sind (SMITH et al. 1985). Weiterhin sollten die geimpften Tiere bei einer Translokation von LPS aus z.B. dem Magen-Darm-Trakt bei Stress und Futterumstellung während des Peripartums geschützt sein (PLAIZIER et al. 2012). Die Vakzinen wurden unter anderem aus diesem Grund systemisch in Form subkutaner Injektionen verabreicht, trotz des Risikos, dass gebildete Antikörper möglicherweise nicht das Lumen der Milchdrüse erreichen würden (COLDITZ und WATSON 1985). WATSON und LASCELLES (1975) konnten jedoch belegen, dass eine systemische Immunisierung während der Trockenstehperiode die Sekretion von spezifischen Antikörpern in der Folgelaktation anregt. Auch die kommerziellen J5-Impfstoffe, deren Wirksamkeit nachgewiesen ist, werden auf diesem Wege appliziert. Trotz der Empfehlungen von ERSKINE et al. (2010), diese Impfungen an verschiedenen anatomischen Lokalisationen vorzunehmen, um die Antikörperbildung zu forcieren, beschränkten sich die subkutanen Injektionen des Impfversuchs je auf die Halsregion, da dies praktikabler in der Umsetzung erschien.

5.2.3 Untersuchungsmaterial und Untersuchungsmethoden

Die Entnahme von Milchproben war erforderlich, um den Eutergesundheitsstatus der Tiere vor und nach der Immunisierung zu bestimmen. Hierzu dienten vorrangig die Bestimmung des Zellgehaltes der Milch mittels der weltweit etablierten Fossomatic®-Methode (IDF 1981), was als Goldstandard in der Diagnostik angesehen wird

(PYÖRÄLÄ 2003), und ein Erregernachweis für jedes Euterviertel (DVG 2012). Anhand dieser Befunde erfolgte eine Kategorisierung der Eutergesundheit nach den Leitlinien der DVG (2012) in Anlehnung an die der IDF (1967). Die DVG (2012) sieht Sekrete mit unter 100.000 Zellen/ml als gesund an, insofern gleichzeitig kein Keimnachweis erfolgte. Bei Euterinfektionen kommt es zu einer starken Einwanderung von Leukozyten und somit zu einem Anstieg der SCC in der Milch (DOHOO und MEEK 1982).

Da häufig eine bakteriologisch positive Milchprobe mit einem Zellgehalt von unter 50.000 Zellen/ml vorlag und das Bestehen einer latenten Infektion in diesem Fall unwahrscheinlich erschien, wurde an dieser Stelle ein Grenzwert festgelegt und bei dessen Unterschreitung von einer Kontamination der Milchprobe ausgegangen. Aufgrund der Vielzahl der aufgetretenen Fälle und der damit verbundenen gefährdeten Auswertbarkeit der Testergebnisse wurden solche Viertelgemelksproben als „eutergesund“ eingestuft. Insgesamt fielen sehr viele Milchproben an, die, bis auf die konservierten Röhrchen zur Zellzahlbestimmung, generell bei -20 °C gelagert werden mussten, um eine einheitliche Bearbeitung gewährleisten zu können. Das Einfrieren von Milchproben wird jedoch von der DVG (2009) aufgrund differierender Untersuchungsergebnisse in der bakteriologischen Diagnostik nicht empfohlen. Da zum Teil höhere oder niedrigere Nachweisraten von *S. aureus* oder KNS beobachtet wurden, können diese Keimisolierungen nur schwer bewertet werden. Weiterhin ergab die Erregeridentifizierung im Versuch per MALDI-TOF-MS eine hohe Diversität von Mikroorganismen, so dass eine Einordnung in Keimgruppen mit einem entsprechenden Scoring-System zwingend notwendig wurde.

Neben den grundlegenden diagnostischen Methoden erfolgte in der Milch der Nachweis von C-reaktivem Protein, welches SCHRÖDL et al. (1995) für einen gut brauchbaren Parameter in der Diagnostik subklinischer Mastitiden hielten und KRÜGER et al. (1995) damit die Effizienz von Vakzinationen bestätigt sahen, sowie der Nachweis von Endotoxinen als Indikator für das Vorhandensein von Gram-negativen Bakterien im Euter nach aufsteigenden Infektionen oder Translokationen aus dem Magen-Darm- oder Genitaltrakt. In veröffentlichten Studien zur Wirksamkeit von Mastitisvakzinen wurden diese Analysen bisher noch nicht durchgeführt.

Die systemische Immunantwort auf die Vakzinierung wurde mittels Bestimmung spezifischer Antikörper im Blutserum vor und nach dem Versuch überprüft. Der Nachweis beschränkte sich auf spezifische IgG₁, die im gesunden Euter in großer

Anzahl vorhanden sind (GUIDRY et al. 1980), und das spezifische IgG₂, welches im Falle einer Infektion in die Milchdrüse sezerniert wird (KORHONEN et al. 2000), obwohl weiterhin auch IgA und IgM in der Milch des Rindes vorhanden sind (SORDILLO und STREICHER 2002), dies jedoch mit eher untergeordneter Bedeutung (RAINARD und CAFFIN 1983). Laut CHAIYOTWITTAYAKUN et al. (2004) sind die Isotypen 1 und 2 des Immunglobulins G die aussagekräftigsten Parameter hinsichtlich einer Immunantwort. Einige jüngere Studien zur Anwendung von J5-Vakzinen beschränken sich ebenso auf den Nachweis von spezifischen IgG₁ und IgG₂ im Blut (ERSKINE et al. 2007 und 2010, WILSON et al. 2009), ältere hingegen (WILSON et al. 1972, RAINARD und CAFFIN 1983, HOGAN et al. 1992^{A+B}, 1997, 1999, SMITH et al. 1999, TOMITA et al. 1995 und 2000) weisen zusätzlich opsonierende Antikörper im Eutersekret nach. Laut den Untersuchungen von PLOEGAERT et al. (2011) besteht jedoch allgemein eine starke Korrelation zwischen den Antikörpertitern in der Milch und im Blut.

Desweiteren wurde versucht, im Blutserum Haptoglobin zu messen, da erhöhte Konzentrationen verschiedenen entzündlichen Erkrankungen zugeordnet werden können, u.a. auch der bovinen Mastitis (CONNER und ECKERSALL 1986, SALONEN et al. 1996, ECKERSALL et al. 2001 und 2006, NIELSEN et al. 2004). Meist handelt sich bei vermehrtem Nachweis um akute Entzündungen (HORADAGODA et al. 1999), die jedoch bei den Versuchstieren dieser Studie lediglich in subklinisch-chronischer Form vertreten waren.

5.3 Diskussion der Versuchsergebnisse

5.3.1 Einfluss der Vakzine auf das Immunsystem

Die subkutane Anwendung der bestandspezifischen *E. coli*-Impfstoffe wurde von allen Versuchstieren gut vertragen, es stellten sich keine lokalen Reaktionen in den Arealen der subkutanen Applikation ein.

Bei allen Versuchstieren waren im Blutserum spezifische Antikörper IgG₁ und IgG₂ gegen die Antigene LCV- und SCV-*E. coli* im Sinne einer systemischen Immunantwort nachzuweisen. Zu Versuchsbeginn (zum Trockenstellen) handelte es sich hierbei um geringe Mengen einer relativen Einheit pro ml (RE/ml), die auf eine vorhergehende Exposition mit den stallspezifischen Keimen zurückzuführen sind. Im Falle von IgG₁ waren zu diesem Zeitpunkt in den Medianwerten der Gruppen

ca. 73 bis 134 RE/ml gegen LCV-*E. coli* und ca. 77 bis 127 RE/ml gegen SCV-*E. coli* nachweisbar. Die IgG₂ gegen LCV-*E. coli* (ca. 23 bis 71 RE/ml) und gegen SCV-*E. coli* (etwa 29 bis 62 RE/ml) lagen insgesamt auf einem niedrigeren Niveau. Nach der Immunisierung zu Versuchsende (30 Tage post partum) war im Gegensatz zu den Kontrolltieren bei allen Impftieren ein deutlicher Anstieg des Blutserumgehaltes an spezifischen Antikörpern zu erkennen, der sich bei den Gruppen A, C und D, jedoch nur annähernd bei der Gruppe B, als signifikant darstellte. Im Blut der Kontrolltiere konnte dagegen kein Anstieg der spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Eine Erklärung für die fehlende Signifikanz des Anstieges der spezifischen Antikörper über den Versuchszeitraum bei den Tieren der Gruppe B besteht in den überdurchschnittlich hohen maximalen Blutserumgehalten an IgG₁ und IgG₂ gegen LCV- und SCV-*E. coli* (siehe Anlagen 6 bis 9 des Anhangs), die durch Exposition bereits vor der Immunisierung vorlagen. Bei den Impfgruppen erfolgte ein mindestens zwei- bis teilweise vierfacher Zuwachs von spezifischen Antikörpern im Serum, so dass ein immunogener Effekt der verschiedenen Vakzinen bestätigt werden konnte. So lagen die Medianwerte von IgG₁ gegen LCV-*E. coli* am 30. Tag p. p. in den Impfgruppen zwischen ca. 241 und 609 RE/ml, die gegen SCV-*E. coli* zwischen 173 und 569 RE/ml. Auch die Anzahl an IgG₂ gegen LCV-*E. coli* (etwa 80 bis 196 RE/ml) und SCV-*E. coli* (ca. 80 bis 239 RE/ml) zum Zeitpunkt 3 zeigte eine deutliche Reaktion des Immunsystems der Tiere auf die Impfung. Eine Übersicht zum Zeitpunktvorgleich der Antikörpergehalte des Serums der Versuchstiere gibt Tabelle 18.

Tab. 18: Zeitpunktvorgleich (vor dem Trockenstellen vs. 30 Tage post partum) der Antikörpertiter der Versuchsgruppen im Serum

	Anstieg signifikant	Anstieg nicht signifikant	kein Anstieg
IgG₁-anti-LCV-<i>E. coli</i>	Gruppen A, C, D	Gruppe B	Kontrollgruppe
IgG₁-anti-SCV-<i>E. coli</i>	Gruppen A, C, D	Gruppe B	Kontrollgruppe
IgG₂-anti-LCV-<i>E. coli</i>	Gruppen A, C, D	Gruppe B	Kontrollgruppe
IgG₂-anti-SCV-<i>E. coli</i>	Gruppen A, C, D	Gruppe B	Kontrollgruppe

Die Antikörperbildung erfolgte unabhängig vom applizierten Antigen, da bei den Tieren der Gruppe A, welchen eine Vakzine mit LCV-*E. coli* verabreicht wurde, ein ähnlich starker Zuwachs an IgG₁ und IgG₂ gegen SCV-*E. coli* zu bemerken war wie bei den Tieren der Gruppe B (Impfung mit SCV-*E. coli*). Umgekehrt zeigten auch die Impftiere dieser Gruppe eine vermehrte Bildung von IgG₁ und IgG₂ gegen LCV-*E. coli*. Diese Kreuzreaktivität ist durch die gleiche Oberflächenbeschaffenheit der Antigene zu erklären. Bei den *small colony variants* (SCVs) von *E. coli* handelt es sich um kleine Kolonieförmungen, die bei ungünstigen Wachstumsbedingungen entstehen und eine geringe metabolische Aktivität aufweisen (COLWELL 1946), eine veränderte Struktur wurde jedoch bisher nicht beschrieben. SCVs, die besser in Zellen persistieren können als die *large colony variants* (LCVs), und einer Therapie mit Antibiotika schwerer zugänglich sind (PROCTOR et al. 2006), sollten somit vom Immunsystem durch die gleichen Antikörper liquidiert werden. Fraglich ist jedoch ihre Zugänglichkeit für diese im Falle einer Erregerpersistenz.

Die Antikörper sind spezifisch für das vollständige O-Antigen des stallspezifischen *E. coli* ausgebildet worden, unabhängig von der Wachstumsform der Kolonien. Eine Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen coliformen Keimen wie bei denen, die durch die Impfung mit den *rough mutants* von *E. coli* mit Defekt des LPS-Moleküls (TYLER et al. 1990^A) entstehen, ist nicht zu erwarten.

Der Nachweis der Antikörper im Serum lässt nicht eindeutig auf ihre Sekretion in das Euter schließen, da kein Nachweis in der Milch erfolgte. Neben der Aussage von PLOEGAERT et al. (2011), dass eine starke Korrelation zwischen den natürlichen Antikörpertitern in der Milch und im Blut besteht, wurde weiterhin davon ausgegangen, dass IgG₁ als dominierende Immunglobulinart im Kolostrum und in der Milch der beginnenden Laktation über einen aktiven Transportmechanismus aus dem Serum in die Alveolarzellen der Milchdrüse verbracht wird, wie KEHRLI und HARP (2001) in einer Zusammenfassung berichteten. Schon GUIDRY et al. (1980) erklärten, dass die IgG₁ den überwiegenden Anteil an Immunglobulinen in der Milch des gesunden Rindereuters ausmachen, so dass ein Nachweis im Sekret nicht für zwingend notwendig erachtet wird. Dies gilt auch für die IgG₂, deren Anzahl im Milchsekret erst während einer Infektion deutlich steigen soll (KORHONEN et al. 2000). Da im Versuchsaufbau jedoch keine experimentelle Infektion berücksichtigt wurde, erschien der Nachweis von IgG₂ in der Milch wenig sinnvoll. Zudem setzten BURTON und ERSKINE (2003) lediglich eine ausreichende Menge an IgG₂ im Blut

voraus, um eine effektive Abwehr von Euterinfektionen zu erzielen, da diese nur einige Stunden nach Auftreten einer Entzündungskaskade in das Euter einströmen und potente Opsonine darstellen, die die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten unterstützen. In Bezug auf die J5-spezifischen Antikörper IgG₁, konnten TYLER et al. (1988) bei niedrigen Serumtitern ein erhöhtes Risiko einer coliformen Mastitis feststellen.

Einige Studien zur Wirksamkeit von Coli-Vakzinen beschränken sich ebenso auf den Nachweis spezifischer Antikörper im Blut. Beispielsweise konnten WILSON et al. (2009) eine mit der J5-Immunisierung assoziierte höhere Antikörperproduktion von spezifischen IgG₁ und IgG₂ nachweisen, die mit weniger Verlusten durch schwerwiegende Colimastitiden verbunden war.

In vielen Forschungsarbeiten konnten nach Immunisierung mittels einer J5-Vakzine hohe Antikörpertiter nachgewiesen werden, jedoch korrelierte die Impfung nicht zwangsläufig mit einer Senkung der Mastitisinzidenz oder einer Senkung des Schweregrades einer coliformen Mastitis (HILL 1991, TOMITA et al. 2000). Oftmals war jedoch ein positiver Einfluss der Impfung auf diese Parameter zu erkennen (GONZÁLEZ et al. 1989, CULLOR 1991, Hogan et al. 1992^A, WILSON et al. 2007^B).

DOSOGNE et al. (2002) sehen den Wirkmechanismus der J5-Vakzinen nicht allein in der Protektion durch spezifische Antikörper. Vielmehr nehmen diese Autoren an, dass die zellvermittelte Immunität eine entscheidendere Rolle spielt. Diese These kann die vorliegende Arbeit mangels Nachweismethoden weder widerlegen noch bestätigen.

Einen Nebeneffekt der Vakzinierung mit der bestandsspezifischen *E. coli*-Vakzine stellt eventuell ein Schutz des Tieres vor septikämischen Erkrankungsformen und stressbedingten Translokationen mit Besiedlung anderer Organe durch den *E. coli*-Stamm oder dessen freie Endotoxine dar, die besonders im peripartalen Zeitraum auftreten können. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass das neugeborene Kalb maternale Antikörper über das Kolostrum erhält, die vor einer neonatalen Sepsis mit *E. coli* als Hauptverursacher schützen können. Hierzu wurden jedoch keine Untersuchungen durchgeführt.

Traumatische oder akut entzündliche Erkrankungen mit Anstieg des Serumhaptoglobins, wie z. B. eine akute Mastitis (CONNER und ECKERSALL 1986, SALONEN et al. 1996, ECKERSALL et al. 2001 und 2006, NIELSEN et al. 2004), lagen bei den Versuchstieren nicht vor, da die Werte dieses APPs bei 93 von 97

Messungen unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Die Bestimmung des Haptoglobins sollte lediglich ergänzend erfolgen, erbrachte jedoch in dem Zusammenhang der Impfung mit einer bestandspezifischen *E. coli*-Vakzine keine nennenswerten Daten, da während des Versuchszeitraumes keine akuten klinischen Mastitiden auftraten. Bei den Tieren mit inapparenten Euterinfektionen konnten keine erhöhten Serumwerte gefunden werden, der Nachweis von Serumhaptoglobin zur Detektion von subklinischen Mastitiden ist somit nicht möglich.

5.3.2 Einfluss der Vakzine auf den Eutergesundheitsstatus

Klinische Mastitiden mit Allgemeinstörungen der Tiere traten im Versuchszeitraum nicht auf, so dass eine Beurteilung des Eutergesundheitsstatus lediglich auf zytobakteriologischer Ebene möglich war.

Die Viertelgemelksproben der Versuchstiere vor dem Trockenstellen ergaben lediglich bei zwei Gruppen im Median unter 100.000 Zellen/ml (Gruppe A 51.000 Zellen/ml; Gruppe C 67.000 Zellen/ml). In den übrigen drei Versuchsgruppen zeigten sich die Medianwerte über 100.000 Zellen/ml (Gruppe D 110.000 Zellen/ml; Gruppe B 185.000 Zellen/ml; Kontrollgruppe 263.000 Zellen/ml), wobei die Kontrollgruppe mit den signifikant höchsten Zellgehalten auffällig wurde, von denen sich nur die der Gruppe B wenig unterschieden. Trotz zufälliger Auswahl der Versuchstiere und deren Einordnung in Gruppen erschien dies als ungünstige Ausgangssituation für die Versuchsreihe, da ausgehend von der Zellzahl als wichtigsten Parameter zur Beurteilung der Eutergesundheit, somit lediglich ein Vergleich zwischen der Gruppe B und den Kontrolltieren möglich war. Zur zweiten Zellzahlmessung 30 Tage nach der Geburt war bei allen Versuchsgruppen eine signifikante Senkung zu beobachten, jedoch lagen noch immer die gleichen Verhältnisse mit kaum unterscheidbaren Medianwerten der Gruppe B und der Kontrolltiere (39.000 Zellen/ml; 35.000 Zellen/ml) und signifikant niedrigeren Werten der Gruppen A, C und D vor (18.000 Zellen/ml; 19.000 Zellen/ml; 20.000 Zellen/ml).

Bei der Betrachtung der Daten sollte bedacht werden, dass zum Ende der Laktation physiologisch höhere Zellzahlen in der Milch vorliegen (DOHOO und MEEK 1982), jedoch lagen diese bei eutergesunden Tieren in einer Studie von LAESENS et al. (1997) im Durchschnitt noch immer unter 100.000 Zellen/ml. In anderen Studien zur Wirksamkeit von reinen Coli-Vakzinen wurden bisher keine vergleichenden Betrachtungen der Zellzahlen nach der Trockenstehperiode durchgeführt. Lediglich

nach provozierter Infektion wie bei den Untersuchungen von WILSON et al. (2007^A) konnte ein positiver Einfluss der J5-Vakzine auf die Zellzahl dargestellt werden. Während nicht-geimpfte Tiere nach einer Infektion durchschnittlich 5.429.000 Zellen/ml aufwiesen, waren es bei geimpften lediglich 490.000 Zellen/ml. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit jedoch nicht um einen Infektionsversuch handelte, kann ein positiver Einfluss der Vakzine anhand der somatischen Zellzahlen nicht eindeutig erkannt werden, auch da in der Trockenstehperiode Selbstheilungsprozesse ablaufen, die allgemein eine Reduktion dieses Wertes verursachen. Anhand der geringen Versuchstierzahlen lässt sich diese Komponente nicht eindeutig ermitteln. Eine Studie, die die Selbstheilung an großen Tierzahlen berücksichtigt, wurde von MARCH et al. (2012) zum Einfluss der Startvac®-Vakzinierung durchgeführt. Hierbei ergaben sich bei den geimpften Tieren im Mittel 328.000 Zellen/ml im Vergleich zu den Kontrollen mit 549.000 Zellen/ml. Dieser positive Effekt muss jedoch nicht ausschließlich auf dem J5-Antigen in der Vakzine beruhen, da es sich bei dem Impfstoff um ein Kombinationspräparat handelt, welches als zweite Hauptkomponente gegen biofilmbildende *S. aureus* vakzinisiert.

Zur Verstärkung der Aussagefähigkeit der Ergebnisse der Zehlzahlbestimmungen wurden in Ergänzung bakteriologische Untersuchungen angefertigt. Die Viertelgemelksproben waren zum großen Teil bakteriologisch positiv, auch wenn die Zellgehalte deutlich unter 100.000 Zellen/ml lagen. Hier hat man sich zu der Einführung eines neuen Grenzwertes entschieden. Unter 50.000 Zellen/ml wurde der Keimbefund als Kontamination gewertet, und die Probe als eutergesund eingestuft. Nach der Korrektur der Ergebnisse ergaben sich zum Zeitpunkt 1 insgesamt noch 95 bakteriologisch positive Viertelgemelksproben von 198 Proben insgesamt, wovon ein Großteil (30 von 95) auf Tiere der Gruppe B entfiel. Zum Zeitpunkt 3 konnten deutlich seltener Erreger isoliert werden, am häufigsten jedoch in Milchproben von den Kontrolltieren (15 von 39 bakteriologisch positiven; insgesamt 187 Proben), was kaum einen Unterschied zu deren 18 Keimnachweisen zum Zeitpunkt 1 ergab. Tendenziell schienen die Tiere der Impfgruppen eine verstärkte Erregereliminierung über den Untersuchungszeitraum vorweisen zu können, da zum Zeitpunkt 3 deutlich mehr Milchproben steril ausfielen als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Leider ließ sich dies aufgrund der geringen Fallzahlen nicht statistisch belegen.

Die zusätzlich bestimmten Gesamtkeimzahlen erbrachten keine sinnvollen ergänzenden Daten, da vor allem hohe Maximalwerte die Auswertung erschwerten.

Diese könnten durch Fehler in der Entnahme, der Lagerung und Untersuchung der Proben durch vermehrtes Keimwachstum entstanden sein und wurden somit vernachlässigt.

Weiterhin wurde jedoch die Verteilung der Erreger betrachtet, die sich bei den Kontrolltieren von Zeitpunkt 1 auf Zeitpunkt 3 kaum veränderte. *Escherichia coli* war vor Versuchsbeginn und zu Versuchsende in fünf Viertelgemelken der Kontrolltiere nachweisbar, was jedoch nicht mit einer klinischen Mastitis einherging. Bei den entsprechenden Proben war eine deutliche Erhöhung der somatischen Zellzahl zu beobachten, somit konnte eher nicht von einer Kontamination ausgegangen werden. Eine subklinische Mastitis durch *E. coli* musste, wie auch schon von HOGAN et al. (1989^A) beschrieben, angenommen werden. Bei den Impftieren wurden zu keinem Zeitpunkt Nachweise von coliformen Keimen geführt.

Bei den Tieren der Impfgruppen konnten 30 Tage post partum im Vergleich zum Zeitpunkt vor dem Trockenstellen deutlich seltener KNS und Streptokokken nachgewiesen werden. In Gruppe D wurden, im Gegensatz zu vorher zwei, zum Versuchsende keine *S. aureus*-Isolierungen mehr vorgenommen. Dagegen trat in den Gruppen A, B und C je eine Neuinfektion mit *S. aureus* auf.

Zusätzlich zu den Verteilungen der verschiedenen Erreger wurden Score-Werte je nach Pathogenität der Keime vergeben, um den Schweregrad der subklinischen Euterinfektionen zu terminieren und eine statistische Auswertung vorzunehmen. Zum Zeitpunkt 1 erfolgten in den Proben der Gruppe B die meisten Keimnachweise, v. a. mit KNS und Streptokokken, was zu den signifikant höchsten Score-Werten führte. Diese verminderten sich zum Zeitpunkt 3 signifikant bei der Gruppe B. Auch bei den Tieren der Gruppen A, C und D ergab sich eine deutliche Reduktion dieser Werte, welche bei den beiden erstgenannten Gruppen signifikant war. Lediglich bei den Kontrolltieren blieben die Score-Werte unverändert. Diese Ergebnisse unterscheiden sich deutlich zu denen von WILSON et al. (2007^B), die durch Vakzination mit einem J5-Impfstoff keinen Unterschied im Keimspektrum zwischen Kontroll- und Impftieren feststellen konnten. In den Untersuchungen von MARCH et al. (2012), die die Kombivakzine Startvac® in einer Feldstudie an 198 Tieren testeten, zeigte nur 32 geimpfte gegenüber 79 ungeimpften Tieren subklinische Eutererkrankungen durch *S. aureus*, Coliforme oder KNS. Diese Ergebnisse zur Wirksamkeit von Startvac® sind tendenziell den hier vorgelegten Resultaten ähnlich. Trotz des Fehlens eines Staphylokokken-Antigens in den bestandsspezifischen Vakzinen kam es zu einer

verringerten Nachweisrate von KNS und auch von Streptokokken, was mit hoher Wahrscheinlichkeit ein zufälliges Ereignis darstellt. Wie auch bei den vorliegenden Ergebnissen der Zellzahlbestimmungen ist der Einfluss der Selbstheilung während der Trockenstehperiode unklar, zumal alle Tiere einheitlich antibiotisch trockengestellt wurden. Eine positive Auswirkung der Immunisierung mittels bestandsspezifischen *E. coli*- Vakzinen kann nur vermutet werden.

Bei Betrachtung der Daten der zytobakteriologischen Untersuchungen und Feststellung des Eutergesundheitsstatus nach den Leitlinien der DVG (2012) bzw. nach dem neu festgelegten Grenzwert zur möglichen latenten Infektion (BU positiv und 50.000 bis 100.000 Zellen/ml) mit Vergabe von Score-Werten zur statistischen Auswertung, ergaben sich zum Zeitpunkt des Trockenstellens die signifikant meisten subklinischen Eutererkrankungen der Euterviertel bei den Tieren der Gruppe B (24 von 40 Vierteln) und der Kontrolle (17 von 39 Vierteln) im Gegensatz zu denen der Gruppen A und D (je 13 / 40) und der Gruppe C (14 / 40). Zwar verbesserte sich bei allen Versuchstieren zum Zeitpunkt 30 Tage nach der Geburt der Eutergesundheitsstatus, jedoch war der Unterschied in Gruppe B am stärksten signifikant. So konnten nur noch 6 von 40 Eutervierteln als subklinisch erkrankt identifiziert werden. Während in der Kontrollgruppe noch immer 8 von 40 ausgewerteten Eutervierteln eine subklinische Mastitis hatten, waren es je nur 4 von 36 in den Gruppe A und C, sowie 3 von 35 in der Gruppe D. Diese Ergebnisse beziehen sich jedoch nur auf die Gesamtanzahl an Eutervierteln einer Versuchsgruppe.

Um eine erweiterte Aussage zu treffen, wurde auf Viertelebene des Einzeltieres ein Zeitpunktvorgleich vorgenommen, um über die Auswirkungen der Trockenstehperiode auf den Euterviertelgesundheitsstatus Erkenntnisse zu erlangen. Eine Ausheilung von bestehenden Infektionen ergab sich in insgesamt 77 Eutervierteln. Prozentual fielen hiervon die meisten Viertel auf Tiere der Gruppen A und D, woraus sich eine statistische Relevanz gegenüber der Kontrollgruppe zeigte. Da in diesen Gruppen jedoch von Versuchsbeginn an die wenigsten inapparenten Euterinfektionen festgestellt wurden, erscheinen diese Ergebnisse fragwürdig.

Beim Vergleich von Gruppe B und der Kontrollgruppe, welche beide einen schlechteren Eutergesundheitsstatus vor dem Trockenstellen aufwiesen, entfallen augenscheinlich mehr Heilungsprozesse auf Euterviertel der Gruppe B. Statistisch konnte dies jedoch nicht belegt werden.

Auch bei Betrachtung des Heilungsvorganges auf Kuhebene war dies zu beobachten. Während in der Kontrollgruppe bei keinem Tier eine vollständige Genesung festgestellt werden konnte, waren es in der Gruppe B immerhin zwei Tiere, in der Gruppe C drei und in den Gruppen A und D sogar vier Kühe.

In der zugänglichen Literatur zu bisher verwendeten reinen Coli-Impfstoffen sind bisher keine Analysen hinsichtlich inapparenter Euterinfektionen durchgeführt worden, meist beschränken sich die Untersuchungen auf klinisch erkrankte Tiere oder Euterviertel. Lediglich bei der in Deutschland zugelassenen Kombinationsvakzine Startvac® wurden auch subklinische Mastitiden erfasst (MARCH et al. 2012), dies erklärt sich jedoch aus den enthaltenen Staphylokokken-Antigenen und den häufiger durch *S. aureus* oder KNS verursachten inapparenten Infektionen. Diese treten aber auch mit *E. coli* auf (DÖPFER et al. 1999, BRADLEY und GREEN 2001^A).

Ergänzend zu den zytobakteriologischen Untersuchungen der Milchproben erfolgte zusätzlich die Bestimmung des CRP und des Endotoxins in der Milch der drei Zeitpunkte des Versuches (vor dem Trockenstellen, 3 und 30 Tage post partum).

Die Ergebnisse der CRP-Untersuchungen zeigen keine Korrelation zu den durch die Impfung gebildeten Antikörper, somit erscheint die von KRÜGER et al. (1995) aufgestellte These, dass durch die Bestimmung von CRP die Effizienz von Vakzinationen geprüft werden könne, nicht bestätigt. Berücksichtigung sollte jedoch finden, dass die Bestimmung des CRP in jenem Versuch wenige Tage nach der Boosterung stattfand, um herauszufinden ob der Körper auf das Antigen reagiert. In dem hier vorliegenden Versuch gibt es keinen ähnlichen zeitlichen Zusammenhang zwischen Impfung und CRP-Bestimmung. Die Untersuchungen auf CRP-Gehalte erfolgten entweder zeitgleich zu Impfungen (Zeitpunkt 1 und 2) oder mit mehr als dreiwöchigem Abstand zur letzten Impfung (Zeitpunkt 3).

Auch wenn sich zum Zeitpunkt 1 die Werte der Gruppen nicht voneinander unterscheiden, ist zum Zeitpunkt 2 ein deutlicher Anstieg bei allen Versuchstieren zu erkennen. Da dieser sich in der Kontrolle und in den Gruppen C und D als signifikant darstellt, lag offensichtlich kein gravierender Unterschied zwischen den ungeimpften und geimpften Versuchstieren vor. Die CRP-Werte, die zum Zeitpunkt 3 bei allen Tieren deutlich unter die Werte der ersten Bestimmung abgesunken waren, zeigten eine insgesamt mit weniger entzündlichen Prozessen verbundene Situation der Milchkühe des Versuchs. Auch wenn zu diesem Zeitpunkt weniger inapparente

Euterinfektionen vorlagen, ergab sich nur eine geringe Korrelation zum Parameter Zellzahl, welche zum Zeitpunkt 1 mit häufiger aufgetretenen subklinischen Mastitiden deutlicher vorhanden war. Der Nutzen von CRP in der Mastitisdiagnostik, wie zuvor von SCHRÖDL et al. (1995) beschrieben, scheint in diesem Zusammenhang somit eher nicht bestätigt.

Die Ergebnisse der Endotoxinbestimmungen in der Milch erbrachten keine zusätzliche Aussage zur Fragestellung der Auswirkung der Vakzine auf den Eutergesundheitsstatus, da zu jedem Zeitpunkt andere Gruppen die höchsten Werte in der Milch, ohne Korrelation zu anderen Parametern zeigten. Lediglich der einheitliche Anstieg von Zeitpunkt 1 auf Zeitpunkt 2 kann durch die im Geburtszeitraum möglichen Translokationen aus dem Magen-Darm- oder Genitaltrakt, wie durch PLAIZIER et al. (2012) beschrieben, zurückgeführt werden. Inwiefern diese erhöhten Endotoxinspiegel in der Milch auf erhöhte Nachweisraten im Blut übertragbar sind, bleibt ungewiss, da hierzu keine Untersuchungen im Blut erfolgten. In der Arbeit von FRITSCH (1998) gingen hohe Endotoxinspiegel im Blut von fiebernden Milchkühen mit gesteigerten Nachweisraten von Bakterien im Milchsekret einher. Da jedoch zum Zeitpunkt 2 (3 Tage nach der Abkalbung) keine zytobakteriologischen Untersuchungen erfolgten und keine Korrelation zum CRP (als Entzündungsmarker in der Milch) vorlag, kann der Effekt der spezifischen Antikörper auf freies Endotoxin in der Milch nicht beschrieben werden.

Im Versuchsplan war des Weiteren eine Verfolgung der Gesamtgemelkszellzahlen der Milchleistungsprüfung vorgesehen, um den möglichen Einfluss der Impfung auf die Folgelaktation zu beurteilen, da in der Literatur meist von einem kurzen Effekt der Immunisierungen ausgegangen wird (TALBOT und LACASSE 2005).

Einerseits wurden die SCC der Laktationsmonate zwei und vier im Vergleich betrachtet. Hier zeigten sich nicht die erwarteten Ergebnisse. Im zweiten Laktationsmonat lag der Medianwert der Tiere der Gruppe C (27.000 Zellen/ml) signifikant unter denen der Gruppe B (60.500 Zellen/ml) und der Kontrolle (134.000 Zellen/ml), während sich die letzten genannten Gruppen nicht statistisch relevant unterschieden, obwohl tendenziell ein Vorteil der Gruppe B gegenüber der Kontrolle erkennbar wurde. Dies zeigte sich auch in der Darstellung der SCC der Folgelaktation im Flussdiagramm (Abb. 12), in welchem ein höheres Zellzahlniveau in der Frühaktation der Kontrolltiere v. a. auch im Gegensatz zu den Tieren der

Gruppe B ersichtlich wurde. Zum vierten Laktationsmonat lagen die Medianwerte der Gruppen auf einem einheitlichen Niveau.

Weiterhin wurden die Zellzahlen der Milchleistungsprüfungen vor dem ersten (Zeitpunkt 1) und zweiten Trockenstellen (im Anschluss an den Versuch) verglichen. Die ungünstige Situation der zufällig ausgewählten Versuchsgruppen schlug sich auch in diesen Ergebnissen nieder. Während vor dem ersten Trockenstellen in der Kontrollgruppe ein Medianwert von 381.000 Zellen/ml bestand, waren es in den Impfgruppen signifikant geringere Zellzahlen (zwischen 88.000 und 142.000 Zellen/ml). Zum nächsten Trockenstellen nach Versuchsende ergaben sich keine statistisch sicherbaren Unterschiede zwischen den fünf Gruppen, jedoch waren die Zellzahlen der Gruppe B sogar noch gestiegen ($p = 0,05$).

Diese Daten müssen nicht zwangsläufig auf einen fehlenden oder negativen Einfluss der Vakzinierung zurückzuführen sein, da eher von einer kurzfristigen potentiellen Wirksamkeit der Impfungen gegen Euterinfektionen ausgegangen wurde. Hyperimmunisierungen wie durch CHAIYOTWITTAYAKUN et al. (2004) und ERSKINE et al. (2007) durchgeführt, könnten die Wirkung verlängern.

Das Vermögen der bestandspezifischen *E. coli*-Vakzine die Inzidenz klinischer Mastitiden zu senken, konnte im Rahmen des vorliegenden Versuches nur schwer beurteilt werden, da die Daten keine statistische Auswertung erlaubten. Jedoch konnte bei den Kontrolltieren im Vergleich zu den Impftieren ein vermehrtes Auftreten von klinischen Mastitiden in der auf den Versuch folgenden Laktation festgestellt werden. Während 16 Euterviertel der Kontrolltiere betroffen waren, zeigten nur 22 Viertel der vier Impfgruppen Symptome einer klinischen Euterinfektion. Bei den Vermerken „Mastitis“ oder „Colimastitis“ im Herdenprogramm konnte jedoch kein Rückschluss auf die infizierende Erregerspezies gezogen werden, da leider in keinem Fall bakteriologische Untersuchungen vorgenommen worden sind. Somit kann auch hierbei nur empirisch ein positiver Einfluss der Impfung vermutet werden.

5.3.3 Schlussfolgerung

Die bestandspezifischen Coli-Vakzinen bewirkten eine eindeutige Steigerung der humoralen Immunität im peripartalen Zeitraum, welchen genauen Effekt die Immunantwort auf die Eutergesundheit in der Folgelaktation hat, bleibt jedoch anhand der vorliegenden Untersuchungen weitgehend unbeantwortet.

Da auch bei mit J5 vakzinieren Tieren eine deutlich höhere Antikörperkonzentration im Serum vorlag als bei ungeimpften Kontrollen (HOGAN et al. 1992^B, TOMITA et al. 2000) und dies mit einer geringeren Inzidenz von schwerwiegenden Colimastitiden korrelierte (TYLER et al. 1988), kann von einem positivem Einfluss der Immunisierung ausgegangen werden. Allgemein wird der Anstieg der Antikörpertiter als Goldstandard für die Wirkung einer Vakzine angesehen (ERSKINE 2012). Von einem stärkeren immunogenen Effekt der SCV-Vakzine ist zu diesem Zeitpunkt nicht auszugehen, daher kann im LCV- oder SCV-Typ geimpft werden

Ob die spezifischen Antikörper zur Neutralisierung von freiem Endotoxin beitragen und somit der hämatogenen Besiedlung des Euters durch translozierte Erreger vorbeugen, kann abschließend nicht bewertet werden, da die gemessenen Endotoxinspiegel in der Milch vermutlich nicht auf die im Blut übertragen werden können. Des Weiteren konnte kein Zusammenhang zu endotoxinpromovierten Translokationen im peripartalen Zeitraum geschaffen werden, da zum Zeitpunkt 2 (3 Tage p. p.) keine zytobakteriologischen Untersuchungen durchgeführt wurden. Für den Nachweis der Fähigkeit der spezifischen Antikörper freies Endotoxin zu neutralisieren, müssten ähnliche Untersuchungen wie bei FRITSCHKE (1998) mit Blut-Endotoxin und Keimnachweis kurz nach der Abkalbung erfolgen.

Außerdem müssen weiterführende Versuche in Herden mit beispielsweise einer hohen Inzidenz an klinischen Mastitiden durch coliforme Keime vorgenommen werden, um die Wirksamkeit der Vakzinen zu testen. Hierbei sollte ein bestandspezifischer *E. coli*-Impfstoff Verwendung finden, der einer größeren Gruppe von Tieren verabreicht wird. Beispielhaft hierfür wäre die Studie von GONZÁLEZ et al. (1989), bei der insgesamt etwa 250 Tiere geimpft und 250 Kühe unbehandelt belassen wurden und somit sicherer eine Aussage zum Vermögen der Vakzine, die Mastitisinzidenz zu senken, getroffen werden konnte. Auch in Bezug auf den potentiellen Effekt auf subklinische Mastitiden müssen weiterführende Versuche anhand von größeren Anzahlen von Tieren mit hoher Zellzahl, mit Berücksichtigung der Selbstheilung wie bei MARCH et al. (2012), durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Manuela Heine

„Einfluss verschiedener bestandsspezifischer *E. coli*-Vakzinen auf die Eutergesundheit von Milchrindern“

Institut für Bakteriologie und Mykologie, Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im August 2013

98 Seiten, 13 Abbildungen, 18 Tabellen, 268 Literaturangaben, 1 Anhang

Schlüsselwörter: Milchrind, Eutergesundheit, Mastitis, bestandsspezifische *E. coli*-Vakzinen

Klinische, vor allem aber auch subklinische Eutererkrankungen von Kühen verursachen massive ökonomische Verluste. Gleichzeitig zeigt die Anwendung von Antibiotika zur Therapie und Metaphylaxe bakteriell bedingter Eutererkrankungen nur mäßige Erfolge. Daher ist der Mastitisprävention über eine Stabilisierung und Aktivierung der körpereigenen Abwehr mit Senkung der Mastitisinzidenz ein hoher Stellenwert einzuräumen.

Das Hauptziel dieser Arbeit lag darin, den Einfluss verschiedener bestandsspezifischer *Escherichia coli*-Vakzinen auf das Abwehrsystem und das Erregervorkommen bei Milchkühen zu überprüfen.

Es wurden Kotproben von Kühen zur Isolierung eines *E. coli*-Stammes aus einem intensiv geführten Projektbetrieb genommen, zu welchem 1.200 Milchrinder gehören. Aus dem Isolat erfolgte die Herstellung von vier Vakzinen. Impfstoff A enthält inaktivierte Originalkulturen von *E. coli-large colony variants* (LCV), während Impfstoff B aus *E. coli-small colony variants* (SCV) bestand. In Vakzine C wurden LCV und SCV zu gleichen Anteilen vermischt. Beim Impfstoff D wurde zu der Mischung aus LCV und SCV ein Adjuvans („20 % SO“) hinzugegeben. Für die Vakzinierungen wurden 50 Kühe des Betriebes zufällig ausgewählt und in

Zehnergruppen aufgeteilt. Eine Gruppe diente als Kontrolle. Die Tiere der vier Impfgruppen erhielten am Tag des Trockenstellens (ca. acht Wochen vor dem errechneten Geburtstermin), drei Wochen später und drei Tage nach der Abkalbung 5 ml des jeweiligen Impfstoffes subkutan injiziert. Zum Trockenstellen, drei Tage sowie 30 Tage nach der Kalbung wurden von den 50 Tieren Viertelgemelksproben genommen. Diese wurden zytobakteriologisch sowie auf C-reaktives Protein (CRP) und Endotoxin untersucht. Weiterhin wurden Blutproben der im Versuch befindlichen Kühe zum Trockenstellen und 30 Tage post partum genommen, und darin die Haptoglobin-Konzentrationen sowie die Gehalte der spezifischen Antikörper IgG₁ und IgG₂ gegen SCV- und LCV-*E. coli* geprüft. Außerdem wurden die Tiere anhand ihrer Milchleistungsdaten und bezüglich des Auftretens von klinischen Mastitiden weiter verfolgt.

Die Untersuchungen auf CRP, Endotoxin und Haptoglobin erbrachten keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Bei den Kühen aller Impfgruppen, jedoch nicht bei den Kontrolltieren, waren im Blutserum die spezifischen Antikörper IgG₁ und IgG₂ gegen die Antigene LCV- und SCV-*E. coli* im Sinne einer vakzinationsbedingten systemischen Immunantwort nachzuweisen. Bei den geimpften Tieren zeigte sich ein bis zu vierfacher Anstieg des Blutserumgehaltes aller vier spezifischer Antikörper, der sich mit Ausnahme der Gruppe B als statistisch signifikant darstellte. Bei den Impftieren traten bis zum Versuchsende signifikant weniger Keimnachweise auf. Vermehrt aufgetretene Verbesserungen des allgemeinen Eutergesundheitsstatus auf Viertel- und Kuhebene sowie eine Senkung der Inzidenz klinischer Mastitiden bei den Impftieren konnten beobachtet, jedoch nicht statistisch belegt werden.

Zusammenfassend bewirkten die zum Einsatz gekommenen bestandsspezifischen *E. coli*-Vakzinen nachweislich eine Steigerung der humoralen Immunität. Tendenziell scheint ein positiver Effekt auf die Eutergesundheit vorhanden zu sein, der sich jedoch anhand der überprüften Daten nicht eindeutig belegen lässt.

7 Summary

Manuela Heine

„The influence of different herd-specific coli vaccines on the udder health of dairy cows“

Institute for Bacteriology and Mycology, Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted August 2013

98 pages, 13 figures, 18 tables, 268 references, 1 appendix

Keywords: dairy cow, udder health, mastitis, herd-specific *E. coli* vaccines

Clinical and especially subclinical diseases of the udder of dairy cows cause massive economical losses. At the same time the application of antibiotics for therapy or metaphylaxis of udder diseases caused by bacteria has only moderate success. For this reason, preventing the occurrence of mastitis by stabilization and also activation of the body's own defense mechanisms simultaneously to reducing the incidence of mastitis has a high priority.

The aim of this study was to test the influence of different herd-specific *E. coli* vaccines on the immune system and the occurrence of pathogens of dairy cows.

From faecal samples that were taken from cows in an intensive-managed dairy farm with an inventory of 1.200 dairy cows, a strain of *Escherichia coli* was isolated. This strain was used to produce four different vaccines. Vaccine A contained the inactivated original strain of *E. coli* (large colony variant, LCV), while vaccine B consisted of an *E. coli*-small colony variant (SCV). Vaccine C contained LCV and SCV in equal amounts, while Vaccine D contained the mixture of LCV and SCV and an adjuvant ("20 % SO"). To test the vaccines, 50 dairy cows were randomly selected and divided into groups of 10 animals. One group of 10 cows served as an untreated control. The cows of the vaccine groups received 5 ml of the vaccine, respectively, subcutaneously, on the day of dry-off (about eight weeks before calculated date of

calving), again three weeks later and a third injection three days after calving. On the day of dry-off as well as three days and 30 days after calving, quarter milk samples were taken from all 50 dairy cows and examined for somatic cell count (SCC), bacterial status, C-reactive protein (CRP) and endotoxin. Furthermore, blood samples were taken on the day of dry-off and 30 days after calving to determine the concentration of haptoglobin and four specific antibodies (IgG₁- and IgG₂-anti-LCV- or -SCV-*E.coli*). All dairy cows were observed for SCC and the occurrence of clinical mastitis based on data of collected by monthly milk performance testing.

Concentrations of CRP, endotoxin and haptoglobin, respectively, did not differ between groups. All vaccinated cows had specific antibodies IgG₁- and IgG₂-anti-LCV/SCV-*E.coli* in the blood demonstrating a specific systemic immune response. The concentration of all four specific antibodies increased up to four times after vaccination, which was statistically significant in all groups with vaccinated cows but in the group with cows that received vaccine B. In all vaccinated dairy cows there was a significantly reduced evidence of bacterial infection at the end of the trial. In tendency, the general udder health, based on quarter and cow level, was improved, as well as the incidence of clinical mastitis reduced.

In summary, the results of this study demonstrate that, using herd-specific *E. coli* vaccines, humoral immunity can be increased. In tendency, there is a positive effect on the udder health. However, this study cannot clearly demonstrate this.

8 Literaturverzeichnis

Almeida RA, Oliver SP. Interaction of coagulase-negative *Staphylococcus* species with bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog*. 2001; 31: 205-12.

Almeida RA, Dogan B, Klaessing S, Schukken YH, Oliver SP. Intracellular fate of strains of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with acute or chronic mastitis. *Vet Res Commun*. 2011; 35: 89-101.

Andersen PH. Bovine endotoxiosis – some aspects of relevance to production disease. A review. *Acta Vet Scand Suppl*. 2003; 98: 141-55.

^AAnon., Wer seinen Gegner kennt, kann Mastitis bekämpfen. 2011 (zitiert vom 30.08.2012): <http://www.tiergesundheitsundmehr.de/archiv/tum_0311/Boehringer0311_13-15.pdf>.

^BAnon., VIDA 2011 (zitiert vom 30.08.2012): <http://vla.defra.gov.uk/reports/docs/rep_vida11_intro.pdf>.

Anri A. Detection of endotoxin in affected milk from cows with coliform mastitis. *Jpn J Vet Sci*. 1989; 51: 847-8.

Barkema HW, Deluyker HA, Schukken YH, Lam TJGM. Quarter-milk somatic cell count at calving and at the first six milkings after calving. *Prev Vet Med*. 1999; 38: 1-9.

Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. The role of cow, pathogen and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Dairy Sci*. 2006; 89: 1877-95.

Barreiro JR, Ferreira CR, Sanvido GB, Kostrzewa M, Maier T, Wegemann B, et al. Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time off light mass spectrometry. *J Dairy Sci*. 2010; 93: 5661-7.

Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15: 74-80.

Bergmann A. Escherichia-coli-, Klebsiella- und Enterobacter-Mastitiden. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Jena: Gustav-Fischer-Verlag; 1994. p. 359-71.

Bhutto AL, Murray RD, Woldehiwet Z. California Mastitis Test scores as indicators of subclinical intramammary infections at the end of lactation in dairy cows. Res Vet Sci. 2012; 92: 13-7.

Bleul U, Sacher K, Corti S, Braun U. Clinical findings in 56 cows with toxic mastitis. Vet Rec. 2006; 159: 677-80.

Blowey RW, Edmondson P. Mastitis control in dairy herds. 2. Aufl. UK: CAB International; 2010.

Booth JM. Progress in mastitis control – an evolving problem. Proceedings of the British Mastitis Conference; 1997; Stoneleigh, UK; 1997: 3-9.

Botrel MA, Haenni M, Morignat E, Sulpice P, Madec JY, Calavas D. Distribution and antimicrobial resistance of clinical and subclinical mastitis pathogens in dairy cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathog Dis. 2010; 7: 479-87.

^ABradley AJ, Green MJ. Adaption of Escherichia coli to the bovine mammary gland. J Clin Microbiol. 2001; 39: 1845-9.

^BBradley AJ, Green MJ. Aetiology of clinical mastitis in six Somerset dairy herds. Vet Rec. 2001; 148: 683-6.

Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. Vet J. 2002; 164: 116-28.

Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ. Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet Rec. 2007; 160: 253-8.

Bramley AJ, Godinho KS, Grindal RJ. Evidence of penetration of the bovine teat duct by *Escherichia coli* in the interval between milkings. *J Dairy Res.* 1981; 48: 379-86.

Burton JL, Erskine RJ. Immunity and mastitis: some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract.* 2003; 19: 1-45.

Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet Res.* 2003; 34: 521-64.

Burvenich C, Bannerman DD, Lippolis JD, Peelman L, Nonnecke BJ, Kehrl Jr. ME, et al. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J Dairy Sci.* 2007; 90 (E Suppl.): E39-E54.

^ABurvenich C, de Spiegeleer B, Schweigert FJ, Winter P. Abwehrmechanismen der Zitze und des Euters. In: Winter P, Hrsg. *Praktischer Leitfaden Mastitis*. 1. Aufl. Stuttgart; Parey-Verlag; 2009. p. 11-6.

^BBurvenich C, de Spiegeleer B, Winter P, Zehle HH. Somatische Zellen und Zellzahlen. In: Winter P, Hrsg. *Praktischer Leitfaden Mastitis*. 1. Aufl. Stuttgart; Parey-Verlag; 2009. p. 17-24.

^CBurvenich C, de Spiegeleer B, Winter P. Entstehung einer Mastitis. In: Winter P, Hrsg. *Praktischer Leitfaden Mastitis*. 1. Aufl. Stuttgart; Parey-Verlag; 2009. p. 25-7.

Calvinho LF, Oliver SP. Invasion and persistence of *Streptococcus dysgalactiae* within bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 678-86.

Calzolari A, Giraudo JA, Rampone H, Odierno L, Giraudo AT, Frigerio C, et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two commercial dairy herds. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 854-8.

Ceciliani F, Ceron JJ, Eckersall PD, Sauerwein H. Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics* 2012; 75: 4207-31.

Chaiyotwittayakun A, Burton JL, Weber PSD, Kizilkaya K, Cardoso FF, Erskine RJ. Hyperimmunization of steers with J5 *Escherichia coli* bacterin: effects on isotype-specific serum antibody responses and cross reactivity with heterogeneous gram-negative bacteria. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 3375-85.

Chang BS, Moon JS, Kang HM, Kim YI, Lee HK, Kim JD, et al. Protective effects of recombinant staphylococcal enterotoxin type C mutant vaccine against experimental bovine infection by a strain of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical mastitis in dairy cattle. *Vaccine* 2008; 26: 2081-91.

Clowes RC, Rowley D. Genetic studies on small colony variants of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol.* 1955; 13: 461-73.

Colditz IG, Watson DL. The immunophysiological basis for vaccinating ruminants against mastitis. *Aust Vet J.* 1985; 62: 145-53.

Colwell CA. Small colony variants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1946; 52: 417-22.

Conner JG, Eckersall PD. Acute phase response and mastitis in the cow. *Res Vet Sci.* 1986; 41: 126-8.

Cullor JS. The *Escherichia coli* J5 vaccine: investigating a new tool to combat coliform mastitis. *Vet Med.* 1991; 86: 836-44.

DeGraves FJ, Fetrow J. Partial budget analysis of vaccinating dairy cattle against coliform mastitis with an *Escherichia coli* J5 vaccine. *J Am Vet Med Assoc.* 1991; 4: 451-5.

Denis M, Lacy-Hubert SJ, Buddle BM, Williamson JH, Wedlock DN. *Streptococcus uberis*-specific T-cells are present in mammary gland secretions of cows and can be activated to kill *S. uberis*. *Vet Res Commun.* 2011; 35: 145-56.

Detilleux JC, Kehrli Jr ME, Stabel JR, Freeman AE, Kelley DH. Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 44: 251-67.

Djabri B, Bareille N, Beaudeau F, Seegers H. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Vet Res.* 2002; 33: 335-57.

Dogan B, Klaessig S, Rishniw M, Almeida RA, Oliver SP, Simpson K, et al. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2006; 116: 270-82.

Dohoo IR, Meek AH. Somatic cell counts in bovine milk. *Can Vet J.* 1982; 23: 119-25.

Döpfer D, Barkema HW, Lam TJGM, Schukken YH, Gaastra W. Recurrent clinical mastitis caused by *Escherichia coli* in dairy cows. *J Dairy Sci.* 1999; 82: 80-5.

Döpfer D, Almeida RA, Lam TJ, Nederbragt H, Oliver SP, Gaastra W. Adhesion and invasion of *Escherichia coli* from single and recurrent clinical cases of bovine mastitis in vitro. *Vet. Microbiol.* 2000; 74: 331-43.

Dosogne H, Capuco AV, Paape M, Roets E, Burvenich C, Fenwick B. Reduction of acyloxyacyl hydrolase activity in circulating neutrophils from cows after parturition. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 672-7.

Dosogne H, Vangroenweghe F, Burvenich C. Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. *Vet Res.* 2002; 33: 1-12.

Dubois D, Leyssene D, Chacornac JP, Kostrzewa M, Schmit PO, Talon R, et al. Identification of a variety of *Staphylococcus* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 941-5.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). Leitlinien zur Entnahme von Milchproben unter aseptischen Bedingungen und Leitlinien zur Isolierung und Identifizierung von Mastitisserregern. Gießen: Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.; 2009.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis als Bestandsproblem. Gießen: Verlag der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.; 2012.

Eaton JW, Brandt P, Mahoney JR, Lee TJ. Haptoglobin – a natural bacteriostat. *Science*. 1982; 215 (4533): 691-3.

Eberhart RJ, Natzke RP, Newbould FHS, Nonnecke B, Thompson P. Coliform mastitis – a review. *J Dairy Sci*. 1979; 62: 1-22.

Eckersall PD, Conner JG. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun*. 1988; 12: 169-78.

Eckersall PD, Young FJ, McComb C, Hogarth CJ, Safi S, Weber A, et al. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec*. 2001; 148: 35-41.

Eckersall PD, Young FJ, Nolan AM, Knight CH, McComb C, Waterston MM, et al. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *J Dairy Sci*. 2006; 89: 1488-501.

Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*. 2010; 185: 23-7.

Ericsson Unnerstad H, Lindberg A, Persson Waller K, Ekman T, Artursson K, Nilsson-Öst M, et al. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. *Vet Microbiol*. 2009; 137: 90-7.

Erskine RJ, VanDyk EJ, Bartlett PC, Burton JL, Boyle MC. Effect of hyperimmunization with an Escherichia coli J5 bacterin in adult lactating dairy cows. J Am Vet Med Assoc. 2007; 231: 1092-7.

Erskine RJ, Brockett AR, Beeching ND, Hull RW, Bartlett PC. Effect of changes in number of doses and anatomic location for administration of an Escherichia coli bacterin on serum IgG1 and IgG2 concentrations in dairy cows. Am J Vet Res. 2010; 71: 120-4.

Erskine RJ. Vaccination strategies for mastitis. Vet Clin North Am Food Anim. 2012; 28: 257-70.

Fehlings K. Hygienemanagement zur Erhaltung der Eutergesundheit und Milchqualität. Prakt Tierarzt 2009; 90: 872-81.

Feng P, Weagant SD, Grant MA, Burkhardt W. Bacteriological Analytical Manual. Enumeration of Escherichia coli and the coliform bacteria. 2002: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.htm>>.

Finch JM, Hill AW, Field TR, Leigh JA. Local vaccination with killed streptococcus uberis protects the bovine mammary gland against experimental intramammary challenge with the homologous strain. Infect Immun. 1994; 62: 3599-603.

Finch JM, Winter A, Walton AW, Leigh JA. Further studies on the efficacy of a live vaccine against mastitis caused by Streptococcus uberis. Vaccine 1997; 15: 1138-43.

Fitzpatrick JL, Cripps PJ, Hill AW, Blan PW, Stokes CR. MHC class II expression in the bovine mammary gland. Vet Immunol Immunopathol. 1992; 32: 13-23.

Fleischer P, Metzner M, Beyerbach M, Hoedemaker M, Klee W. The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows. J Dairy Sci. 2001; 84: 2025-35.

Fritsche J. Endotoxinpromovierte bakterielle Translokationen und Besiedlung von Uterus und Euter beim Hochleistungsrind im peripartalen Zeitraum [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 1998.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase-proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999; 340: 448-54.

Gallati H, Pracht I. Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H_2O_2 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1985; 23: 453-60.

George LW, Divers TJ, Ducharme N, Welcome FL. Diseases of the Teats and Udder. In: Rudolph P, Hrsg. *Rebhuhn's Diseases of Dairy Cattle.* 2. Aufl. St. Louis: Saunders Elsevier; 2008. p. 327-94.

Gernand E, Rehbein P, von Borstel UU, König S. Incidences and genetic parameters for mastitis, claw disorders and common health traits recorded in dairy cattle contract herds. *J Dairy Sci.* 2012; 95: 2144-56.

Geyer H. Äußere Haut, Integumentum commune, Milchdrüse, Mamma. In: Salomon FV, Geyer H, Gille U, Hrsg. *Anatomie für die Tiermedizin.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2008. p. 645-55.

Gianeechini R, Concha C, Rivero R, Delucci I, Moreno Lopez J. Occurrence of clinical and sub-clinical mastitis in dairy herds in the West Littoral Region in Uruguay. *Acta Vet Scand.* 2002; 43: 221-30.

Giraud JA, Calzolari A, Rampone H, Rampone A, Giraud AT, Bogni C, et al. Field trials of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J Dairy Sci.* 1997; 80: 845-53.

González RN, Cullor JS, Jasper DE, Farver TB, Bushnell RB, Oliver MN. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. *Can J Vet Res.* 1989; 53: 301-5.

González RN, Jasper DE, Kronlund NC, Farver TB, Cullor JS, Bushnell RB, et al. Clinical mastitis in two California dairy herds participating in contagious mastitis control programs. *J Dairy Sci.* 1990; 73: 648-60.

Green M, Bradley AJ. Coliform mastitis: an evolving problem? *Cattle Pract.* 2002; 6: 91-4.

Guidry AJ, Butler JE, Pearson RE. IgA, IgG1, IgG2, IgM and BSA in serum and mammary secretion throughout lactation. *Vet Immunol Immunopathol.* 1980; 1: 329-41.

Gürtler H, Schweigert FJ. Physiologie der Laktation. In: von Engelhardt W, Breves G, Hrsg. *Physiologie der Haustiere.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2005. p. 572-93.

Gyles CL, Fairbrother JM. *Escherichia coli.* In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, Hrsg. *Pathogenesis of bacterial infections in animals.* 4. Aufl. Ames: Wiley-Blackwell; 2010. p. 267-308.

Haasmann S, Schulz J. Labordiagnostische Untersuchungen. Grundsätze der Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. *Euter- und Gesäugekrankheiten.* 1. Aufl. Jena: Gustav-Fischer-Verlag; 1994. p. 269-79.

Hagoki E, Shimada Y. Perchloric acid treatment and use of chromogenic substrate in the limulus test: application to veterinary diagnosis. *Vet Microbiol.* 1984/85; 10: 33-42.

Hamann J, Krüger M, Kretschmar M, Nipp B, Gyodi P. C-reactive protein in milk of healthy and subclinically diseased bovine udder quarters. *Milchwissenschaft* 1997; 52: 546-50.

Hamann J, Zeconi A. Evaluation of the electrical conductivity of milk as a mastitis indicator. *IDF Bull.* 1998; 334: 5-22.

Harmon RJ. Physiology of mastitis and factors effecting somatic cell counts. J Dairy Sci. 1994; 77: 2103-12.

Heringstad B, Klemetsdal G, Steine T. Selection responses for clinical mastitis and protein yield in two Norwegian dairy cattle selection experiments. J Dairy Sci. 2003; 86: 2990-9.

Hermans K, Devriese LA, Haesebruck F. Staphylococcus. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, Hrsg. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4. Aufl. Ames: Wiley-Blackwell; 2010. p. 75-89.

Hill AW, Shears AL, Hibbit KG. The elimination of serum-resistant *Escherichia coli* from experimentally infected single mammary glands of healthy cows. Res Vet Sci. 1978; 25: 89-93.

Hill AW. Vaccination of cows with rough *Escherichia coli* mutants fails to protect against experimental intramammary bacterial challenge. Vet Res Commun. 1991; 15: 7-16.

Hill AW. *Escherichia coli* mastitis. In: Gyles CL, Hrsg. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford: CAB International; 1994. p. 117-33.

Hill AW, Finch JM, Field TR, Leigh JA. Immune modification of the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis in the dairy cow. FEMS Immunol Med Microbiol. 1994; 8: 109-18.

Hiss S, Mielenz M, Bruckmaier RM, Sauerwein H. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. J Dairy Sci. 2004; 87: 3778-84.

Hoeben D, Burvenich C, Trevisi E, Berton G, Hamann J, Bruckmaier RM, et al. Role of endotoxin and TNF α in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. J Dairy Res. 2000; 67: 503-14.

Hoedemaker M, Korff B, Edler B, Emmert M, Bleckmann E. Dynamics of *Staphylococcus aureus* infections during vaccination with an autogenous bacterin in dairy cattle. J Vet Med. 2001; 48: 373-83.

Hoedemaker M, Mansfeld R, de Kruif A. Eutergesundheit und Milchqualität. In: de Kruif A, Mansfeld R, Hoedemaker M, Hrsg. Tierärztliche Bestandsbetreuung beim Milchrind. 2. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2007. p. 72-104.

^AHogan JS, Smith KL, Hoblet KH, Schoenberger PS, Todhunter DA, Hueston WD, et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell herds. J Dairy Sci. 1989; 72: 1547-56.

^BHogan JS, Smith KI, Hoblet KH, Schoenberger PS, Todhunter DA, Hueston WD, et al. Bacterial counts in bedding materials used in nine commercial dairies. J Dairy Sci. 1989; 72: 250-8.

^AHogan JS, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine. J Dairy Sci. 1992; 75: 78-84.

^BHogan JS, Weiss WP, Todhunter DA, Smith KL, Schoenberger PS. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. J Dairy Sci. 1992; 75: 415-22.

Hogan JS, Weiss WP, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. J Dairy Sci. 1995; 78: 285-90.

Hogan JS, Smith KL, Schoenberger P, Romig S, Thompson L. Responses of antibody titers to intramammary immunization with *Escherichia coli* J5 bacterin. J Dairy Sci. 1997; 80: 2398-402.

Hogan JS, Bogacz VL, Aslam M, Smith KL. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 Bacterin administered to primigravid heifers. J Dairy Sci. 1999; 82: 939-43.

Hogan JS, Smith KL. Coliform mastitis. Vet Res. 2003; 34: 507-19.

Horadagoda NU, Knox KMG, Gibbs HA, Reid SWJ, Horadagoda A, Edwards SER, et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. Vet Rec. 1999; 144: 437-41.

IDF (International Dairy Federation). International Dairy Federation. Ann. Bull. 1967; Teil 3.

IDF (International Dairy Federation). Laboratory methods for use in mastitis work. IDF Doc. 1981; 132.

Jain NC. Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. J Dairy Sci. 1979; 62: 128-34.

Jarp J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. Vet Microbiol. 1991; 27: 151-8.

Jensen PT, Christensen K. Genetic analysis of the serum level of IgG2 and total protein in Red Danish Cattle. J Anim Sci. 1975; 40: 392-6.

Kaipanen T, Pohjanvirta T, Shpigel NY, Shwimmer A, Pyörälä S, Pelkonen S. Virulence factors of *Escherichia coli* isolated from bovine clinical mastitis. Vet Microbiol. 2002; 85: 37-46.

Kalmus P, Aasmäe B, Kärssin A, Orro T, Kask K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. Acta Vet Scand. 2011; 53: 4.

Kehrli ME, Harp JA. Immunity in the mammary gland. Vet Clin North Am: Food Anim Pract. 2001; 17: 495-516.

Kirst E. Mastitiden rechtzeitig sanieren. Prakt Tierarzt 2008; 89: 582-91.

Kirst E, Jäsert S, Döring L. Untersuchungen über das Mastitiserregerspektrum in Sachsen-Anhalt. *Prakt Tierarzt*. 2009; 90: 3, 256-64.

Kitchen B. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J Dairy Res*. 1981; 48: 167-88.

Korhonen H, Marnila P, Gill HS. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr*. 2000; 84 (Suppl. 1): S75-S80.

Kossaibati MA, Esslemont RJ. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet J*. 1997; 154: 41-51.

Koyama I, Matsunaga T, Harada T, Hokari S, Komoda T. Alkaline phosphatases reduce toxicity of lipopolysaccharides in vivo and in vitro through dephosphorylation. *Clin Biochem* 2002; 35: 455-61.

Krabisch P, Gangl A, Wittkowski G, Fehlings K. Prävalenz der Antibiotika-Resistenz in Milchviehherden bei Infektionserregern mit humanmedizinischer Bedeutung. *Chemotherapie J* 1999; 8: 210-8.

Krömker V. Klinische Mastitis als Bestandsproblem. *Prakt. Tierarzt* 2009; 90: 865-71.

Krüger M, Schrödl W, Lindner A, Kunze R. C-reaktives Protein (CRP) – ein Akut-Phase-Protein mit labormedizinischer Bedeutung in der Veterinärmedizin. *Tierärztl Prax*. 1995; 23(G): 236-40.

Krüger M, Neumann A. Untersuchungen zum Verhalten von C-reaktivem Protein, Zellzahl, Laktosegehalt sowie der elektrischen Leitfähigkeit in Viertelanfangsgemelkproben subklinisch erkrankter Euterviertel in Beziehung zum bakteriologischen Befund. *Tierärztl Prax*. 1999; 27(G): 164-7.

Laevens H, Deluyker H, Schukken YH, de Meulemeester L, Vandermeersch R, de Muëlenaere E, et al. Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J Dairy Sci*. 1997; 80: 3219-26.

Lai IH, Tsao JH, Lu YP, Lee JW, Zhao X, Chien FL, et al. Neutrophils as one of the major haptoglobin sources in mastitis effected milk. *Vet Res.* 2009; 40: 17.

Lam TJGM, Schukken YH, van Vliet JH, Grommers FJ, Tielen MJM, Brand A. Effect of natural infection with minor pathogens on susceptibility to natural infection with major pathogens in the bovine mammary gland. *Am J Vet Res.* 1997; 58: 17-22.

Lee WC, Hsiao HC, Wu YL, Lin JH, Lee YP, Fung HP, et al. Serum C-reactive protein in dairy herds. *Can J Vet Res.* 2003; 67: 102-7.

Lehtolainen T, Pohjanvirta T, Pyörälä S, Pelkonen S. Association between virulence factors and course of *Escherichia coli* mastitis. *Acta Vet. Scand.* 2003; 44: 203-5.

Leigh JA. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Vet J.* 1999; 157: 225-38.

Leigh JA. Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*- current status and future prospects. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 480: 307-11.

^ALeitner G, Lubashevsky E, Glickman A, Winkler M, Saran A, Trainin Z. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. I. Challenge trials. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 93: 31-8.

^BLeitner G, Yadlin N, Lubashevsky E, Ezra E, Glickman A, Chaffer M, et al. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 93: 153-8.

Leitner G, Krifucks O, Kiran MD, Balaban N. Vaccine development for the prevention of staphylococcal mastitis in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 142: 25-35.

Lin J, Hogan JS, Aslam M, Smith KL. Immunization of cows with ferric enterobactin receptor from coliform bacteria. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 2151-8.

Lipman LJA, de Nijs A, Lam TJGM, Gaastra W. Identification of *Escherichia coli* strains from cows with clinical mastitis by serotyping and DNA polymorphism patterns with REP and ERIC primers. *Vet Microbiol.* 1994; 43: 13-9.

Luby CD, Middleton JR, Ma J, Rinehart CL, Bucklin S, Kohler C, et al. Characterization of the antibody isotype response in serum and milk of heifers vaccinated with a *Staphylococcus aureus* bacterin (Lysigin™). *J Dairy Res.* 2007; 74: 239-46.

Luczak S, Steffl M, Amselgruber WM. Einfluss der Milchleistung auf die Inzidenz ausgewählter Erkrankungen bei Hochleistungskühen. *Tierärztl Prax.* 2009; 37 (G): 221-8.

Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, et al. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cows and calf health. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 585-95.

March R, Foix A, Noguera M, Guix R, Prenafeta A, Stellbrink E. Bewertung der Wirksamkeit eines neuen Impfstoffes gegen Mastitis bei Rindern – Ergebnisse der Feldversuche. *Tierärztl Umschau.* 2012; 67: 51-4.

Maudsley S, Rowe IF, de Beer FC, Munn EA, Herbert J, Feinstein A, et al. Identification and isolation of two pentraxins from bovine serum. *Clin Exp Immunol.* 1987; 67: 662-73.

Mc Clure AM, Christopher E, Wolff WA, Fales WH, Krause GF, Miramonti J. Effect of Re-17 mutant *Salmonella typhimurium* bacterin toxoid on clinical coliform mastitis. *J Dairy Sci.* 1994; 77: 2272-80.

Mc Dermott CM, Morrill JL, Fenwick BW. Deacylation of endotoxin during natural cases of bovine mastitis. *J Dairy Sci.* 1991; 74: 1227-34.

Mellenberger RW. Vaccination against mastitis. *J Dairy Sci.* 1977; 60: 1016-21.

Mielke H. Physiologie der Laktation des Rindes. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Jena: Gustav-Fischer-Verlag; 1994. p. 64-105.

Miller RH, Guidry AJ, Paape MJ, Dulin AM, Fulton LA. Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. Am J Vet Res. 1988; 49: 42-5.

Middleton JR, Luby CD, Adams DS. Efficacy of vaccination against staphylococcal mastitis: a review and new data. Vet Microbiol. 2009; 134: 192-8.

Morimoto K, Shimizu M, Kurose T, Nakatani K, Akita S, Shinozuka Y, et al. Efficacy of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine for bovine clinical mastitis. J Dairy Res. 2011; 78: 149-53.

Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Vet J. 2004; 168: 28-40.

Musser JMB, Anderson KL. Effect of vaccination with an *Escherichia coli* bacterin-toxoid on milk production in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc. 1996; 209: 1291-3.

Mweu MM, Nielsen SS, Halasa T, Toft N. Annual incidence, prevalence and transmission characteristics of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. Prev Vet Med. 2012; 106: 244-50.

Neave FK, Dodd FH, Kingwill RG, Westgarth DR. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J Dairy Sci. 1969; 52: 696-707.

Neijenhuis F, Barkema HW, Hogeveen H, Noordhuizen JPTM. Relationship between teat-end callosity and occurrence of clinical mastitis. J Dairy Sci. 2001; 84: 2664-72.

Nemeth J, Muckle CA, Gyles CL. In vitro comparison of bovine mastitis and fecal *Escherichia coli* isolates. Vet Microbiol. 1994; 40: 231-8.

Neumann A, Krüger M. Einfluss des Laktationsstadiums (1.-20.Laktationswoche) auf die Dynamik des C-reaktiven Proteins (CRP) in Viertelanfangsgemelkproben in Beziehung zu Zellzahl, Laktosegehalt und Blutserum-CRP-Gehalt. Tierärztl Prax. 1999; 27(G): 110-3.

Nickerson SC, Pankey JW. Cytologic observations of the bovine teat end. Am J Vet Res. 1983; 44: 1433-41.

Nickerson SC. Resistance mechanisms of the bovine udder: new implications for mastitis control at the teat end. J Am Vet Med Assoc. 1987; 191: 1484-8.

Nickerson SC, Owens WE, Boddie RL. Effect of a *Staphylococcus aureus* bacterin on serum antibody, new infection and mammary histology in nonlactating dairy cows. J Dairy Sci. 1993; 76: 1290-7.

Nielen M, Deluyker H, Schukken YH, Brand A. Electrical conductivity of milk: measurement. Modifiers and meta-analysis of mastitis detection performance. J Dairy Sci. 1992; 75: 606-14.

Nielen M, Schukken YH, Brand A. Detection of subclinical mastitis from on-line milking parlor data. J Dairy Sci. 1995; 78: 1039-49.

Nielsen BH, Jacobsen S, Andersen PH, Niewold TA, Heegard PMH. Acute phase protein concentrations in serum and milk from healthy cows, cows with clinical mastitis and cows with extramammary inflammatory conditions. Vet Rec. 2004; 154: 361-5.

NMC. Recommended mastitis control program. 2009 (zitiert vom 26.09.2012): <<http://www.nmconline.org/docs/NMCchecklistInt.pdf>>.

Nordhaug ML, Nesse LL, Norcross NL, Gudding R. A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. 1. Clinical parameters. J Dairy Sci. 1994; 77: 1267-75.

O'Brien CN, Guidry AJ, Douglass LW, Westhoff DC. Immunization with *Staphylococcus aureus* lysate incorporated into microspheres. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 1791-9.

Olde Riekerink RGM, Barkema HW, Kelton DF, Scholl DT. Incidence rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 2008; 91: 1366-77.

Oliver SP, Sordillo LM. Udder health in the periparturient period. *J Dairy Sci.* 1988; 71: 2584-606.

Østerås O, Sølverød L, Reksen O. Milk culture results in a large Norwegian survey – effects of season, parity, days in milk, resistance and clustering. *J Dairy Sci.* 2009; 89: 1010-23.

Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Vet Res.* 2003; 34: 597-627.

Paduch JH, Mohr E, Krömker V. The association between teat end hyperkeratosis and teat canal microbial load in lactating dairy cattle. *Vet Microbiol.* 2012; 158: 353-9.

Pankey JW, Boddie NT, Watts JL, Nickerson SC. Evaluation of protein A and a commercial bacterin as vaccines against *Staphylococcus aureus* mastitis by experimental challenge. *J Dairy Sci.* 1985; 68: 726-31.

Panousis N, Roubies N, Karatzias H, Frydas S, Papasteriadis A. Effect of selenium und vitamin E on antibody production by dairy cows vaccinated against *Escherichia coli*. *Vet Rec.* 2001; 149: 643-6.

Pellegrino M, Giraudo J, Raspanti C, Nagel R, Odierno L, Primo V, et al. Experimental trial In heifers vaccinated with *Staphylococcus aureus* avirulent mutant against bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2008; 127: 186-90.

Pellegrino M, Giraudo J, Raspanti C, Odierno L, Bogni C. Efficacy of immunization against bovine mastitis using a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant vaccine. *Vaccine* 2010; 28: 4523-8.

Pérez MM, Prenafeta A, Valle J, Penadés J, Solano C, Marco J, et al. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl β -1,6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine* 2009; 27: 2379-86.

Persson K, Larsson I, Hallen Sandgren C. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993; 37: 99-112.

Persson Y, Nyman AKJ, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. *Acta Vet Scand.* 2011; 53: 36.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegard PMH. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004; 35: 163-87.

Petzl W, Schuberth HJ. Impfung vs. Immunmodulation, Konzepte zur Mastitisbekämpfung. Tagungsband der Arbeitsgruppe Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis; 2012 März 22-23; Grub, Deutschland. Gießen: DVG-Verlag; 2012.

Philpot WN. Control of mastitis by hygiene and therapy. *J Dairy Sci.* 1979; 62: 168-76.

Piepers S, De Meulemeester, L, de Kruif A, Opsomer G, Barkema HW, De Vliegher S. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res.* 2007; 74: 478-83.

Pitkälä A, Haveri M, Pyörälä S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001 – prevalence, distribution of bacteria and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 2004; 87: 2433-41.

Plaizier JC, Khafipour E, Li S, Gozho GN, Krause DO. Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health consequences. *Anim Feed Sci Techn.* 2012; 172: 9-21.

Ploegaert TCW, Tijhaar E, Lam TJGM, Taverne-Thiele A, van der Poel JJ, van Arendonk JAM, et al. Natural antibodies in bovine milk and blood plasma: variability among cows, repeatability within cows and relation between milk and plasma titers. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 144: 88-94.

Pol M, Ruegg PL. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 249-61.

Politis I, Zhao X, McBride BW, Burton JH. Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 1992; 30: 399-410.

Prado ME, Almeida RA, Ozen C, Luther DA, Lewis MJ, Headrick SJ, et al. Vaccination of dairy cows with recombinant *Streptococcus uberis* adhesion molecule induces antibodies that reduce adherence to and internalization of *S. uberis* into bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 14: 201-8.

Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I, Costa L. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-imbedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 134: 208-17.

Prenafeta A. General aspects of biofilm and implication in ruminant mastitis. *Irish Vet J.* 2010; 63: 350-4.

Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nature Reviews Microbiol.* 2006; 4: 295-305.

Pyörälä S. New strategies to prevent mastitis. *Reprod Dom Anim.* 2002; 37: 211-6.

Pyörälä S. Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res.* 2003; 34: 565-78.

Pyörälä S, Taponen S. Coagulase-negative staphylococci – emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol.* 2009; 134: 3-8.

Rainard P, Caffin JP. Sequential changes in serum albumin, immunoglobulin (IgG1, IgG2, IgM) and lactoferrin concentrations in milk following infusion of *Escherichia coli* into the udder of immunized and unimmunized cows. *Ann Rech Vet.* 1983; 14: 271-9.

Rainard P. Experimental mastitis with *Escherichia coli*: sequential response of leukocytes and opsonic activity in milk of immunised and unimmunised cows. *Ann Rech Vet.* 1983; 14: 281-6.

Reinecke A. Epidemiologie peripartaler Mastitiden bei Erstkalbinnen [Dissertation med. vet.]. Berlin: Freie Univ. Berlin; 2007.

Reinhardt TA, Stabel JR, Goff JP. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances milk antibody titers to *Escherichia coli* J5 vaccine. *J Dairy Sci.* 1999; 82: 1904-9.

Roesch M, Doherr MG, Schären W, Schällibaum M, Blum JW. Subclinical mastitis in dairy cows in Swiss organic and conventional production systems. *J Dairy Res.* 2007; 74: 86-92.

Ruegg PL, Reinemann DJ. Milk quality and mastitis tests. *Bov Pract.* 2002; 36: 41-54.

Ruegg PL. New perspectives in udder health management. Vet Clin North Am Food Anim. 2012; 28: 149-63.

Salonen M, Hirvonen J, Pyörälä S, Sankari S, Sandholm M. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. Res Vet Sci. 1996; 60: 88-91.

Sampimon O, Barkema HW, Berends I, Sol J, Lam T. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. J Dairy Res. 2009; 76: 129-36.

Sargeant JM, Morgan Scott H, Leslie KE, Ireland MJ, Bashiri A. Clinical mastitis in dairy cattle in Ontario: frequency of occurrence and bacteriological isolates. Can Vet J. 1998; 39: 33-8.

Sargeant JM, Leslie KE, Shirley JE, Pulkcrabek BJ, Lim GH. Sensitivity and specificity of somatic cell count and California Mastitis Test for identifying intramammary infection in early lactation. J Dairy Sci. 2001; 84: 2018-24.

Schällibaum M. Mastitis pathogens in Switzerland 1988-1994. IDF, Mastitis Newsletter 1996; 21: 29.

Schalm O, Noorländer D. Experiments and observations leading to the development of California mastitis test. J Am Vet Med Assoc. 1957; 130: 199-204.

Schalm OW., Carroll EJ, Jain NC. Bovine mastitis. Philadelphia: Lea and Febiger; 1971; p. 81-9.

Schnorr B, Kressin M. Embryologie der Haustiere. 5. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2006.

Schrödl W, Krüger M, Hien TT, Földner M, Kunze R. Das C-reaktive Protein als neuer Parameter bei Mastitis. Tierärztl Prax. 1995; 23 (G): 337-41.

Schulz J. Grundsätze der Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Jena: Gustav-Fischer-Verlag; 1994. p. 226-301.

Schukken YH, Wilson DJ, Welcome F, Garrison-Tikofsky L, González RN. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. Vet Res. 2003; 34: 579-96.

Schwarz D, Diesterbeck US, Failing K, König S, Brügemann K, Zschöck M, et al. Somatic cell counts and bacteriological status in quarter foremilk samples of cows in Hessen, Germany - a longitudinal study. J Dairy Sci. 2010; 93: 5716-28.

Schweigert FJ. Blut-Euter-Schranke. Abwehrmechanismen der Zitze und des Euters. In: Winter P, Hrsg. Praktischer Leitfaden Mastitis. Stuttgart: Parey-Verlag; 2009. p. 16.

Schweigert FJ, Burvenich C, de Spiegeleer B, Winter P. Chemische Faktoren. Abwehrmechanismen der Zitze und des Euters In: Winter P, Hrsg. Praktischer Leitfaden Mastitis. Stuttgart: Parey-Verlag; 2009. p. 14.

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. Vet Res. 2003; 34: 475-91.

Seffner W, Schulz J. Pathogenese. Grundsätze der Erkrankungen der Milchdrüse des Rindes. In: Wendt K, Bostedt H, Mielke H, Fuchs HW, Hrsg. Euter- und Gesäugekrankheiten. 1. Aufl. Jena: Gustav-Fischer-Verlag; 1994. p. 238-44.

Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Rolle, Mayr, Hrsg. Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Aufl. Stuttgart: Enke-Verlag; 2002. p. 417-588.

Selye H. The general adaption syndrome and the diseases of adaption. J Clin Endocrin. 1946; 6: 117-230.

Shkreta L, Talbot BG, Diarra MS, Lacasse P. Immune response to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine* 2004; 23: 114-26.

Shpigel NY, Elazar S, Rosenshine I. Mammary pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol*. 2008; 11: 60-5.

Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Internat J Parasitol*. 2003; 33: 469-78.

Smith KL. Mastitis control: a discussion. *J Dairy Sci*. 1983; 66: 1790-4.

Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J Dairy Sci*. 1985; 68: 1531-53.

Smith JL, Hogan JS, Smith KL. Efficacy of intramammary immunization with an *Escherichia coli* J5 bacterin. *J Dairy Sci*. 1999; 82: 2582-8.

Sobiraj A, Kron A, Schollmeyer U, Failing K. Bundesweite Untersuchung zur Erregerverteilung und In-vitro-Resistenz euterpathogener Bakterien in der Milch von Kühen mit subklinischer Mastitis. *Tierärztl Prax*. 1997; 25 (G): 108-15.

Sordillo LM, Shafer- Weaver K, DeRosa D. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci*. 1997; 80: 1851-65.

Sordillo LM, Streicher KL. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mamm Gland Biol Neopl*. 2002; 7: 135-46.

Sordillo LM. Factors effecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Prod Sci*. 2005; 98: 89-99.

Ster C, Beaudoin F, Diarra M, Jacques M, Maloian F, Lacasse P. Evaluation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated proteins as vaccine targets. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010; 136: 311-8.

Suriyasathaporn W, Schukken YH, Nielsen M, Brand A. Low somatic cell count: a risk factor for subsequent clinical mastitis in a dairy herd. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 1248-55.

Suojala L, Pohjanvirta T, Simojoki H, Myllyniemi AL, Pitkälä A, Pelkonen S., et al. Phylogeny, virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated in clinical bovine mastitis. *Vet Microbiol.* 2011; 147: 383-8.

Takemura K, Hogan JS, Lin J, Smith KL. Efficacy of Immunization with ferric citrate receptor FecA from *Escherichia coli* on induced coliform mastitis. *J Dairy Sci.* 2002; 85: 774-81.

Talbot BG, Lacasse P. Progress in the development of mastitis vaccines. *Livestock Prod Sci.* 2005; 98: 101-13.

Taponen S, Simojoki H, Haveri M, Larsen HD, Pyörälä S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. *Vet Microbiol.* 2006; 115: 199-207.

Taponen S, Pyörälä S. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis – not so different from *Staphylococcus aureus*? *Vet Microbiol.* 2009; 134: 29-36.

Targowski SP. Role of immune factors in protection of mammary gland. *J Dairy Sci.* 1983; 66: 1781-9.

Tenhagen BA, Edinger D, Baumgärtner B, Kalbe P, Klünder G, Heuwieser W. Efficacy of a herd-specific vaccine against *Staphylococcus aureus* to prevent post-partum mastitis in dairy heifers. *J Vet Med.* 2001; 48: 601-7.

Tenhagen BA, Köster G, Wallmann J, Heuwieser W. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 2542-51.

Thielen MA, Mielenz M, Hiss S, Zerbe H, Petzl W, Schuberth HJ, et al. Cellular localization of haptoglobin mRNA in the experimentally infected bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 1215-9.

Tillet WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of *Pneumococcus*. *J Exp Med.* 1930; 52: 561-71.

Timoney JF. *Streptococcus*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, Hrsg. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 4. Aufl. Ames: Wiley-Blackwell; 2010. p. 51-73.

Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS. Environmental Streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 1995; 78: 2366-74.

Tomita GM, Nickerson SC, Owens WE, Wren B. Influence of route of administration against experimental intramammary infection caused by *Escherichia coli*. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 2159-64.

Tomita GM, Ray CH, Nickerson SC, Owens WE, Gallo GF. A comparison of two commercial available *Escherichia coli* J5 vaccines against *E. coli* intramammary challenge. *J Dairy Sci.* 2000; 83: 2276-81.

Treese JM, Morse GE, Levy C. Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *J Dairy Sci.* 1966; 49:1240-4.

Tyler JW, Cullor JS, Osburn BI, Bushnell RB, Fenwick BW. Relationship between serologic recognition of *Escherichia coli* O111:B4 (J5) and clinical coliform mastitis. *Am J Vet Res.* 1988; 49: 1950-4.

^ATyler JW, Cullor JS, Dellinger JD. Cross-reactive affinity of immunoglobulin recognizing common gram-negative bacterial core antigens. *J Immunol Methods.* 1990; 129: 221-6.

^BTyler JW, Cullor JS, Spier SJ, Smith BP. Immunity targeting common core antigens of gram-negative bacteria. *J Vet Int Med.* 1990; 4: 17-25.

Uhlenbrock F, Steliopoulos P, Spohr M. Ergebnisse eines kontrollierten Impfversuches mit Startvac® in einer Herde mit gehäuft auftretenden KNS-Mastitiden. Tagungsband der Arbeitsgruppe Sachverständigenausschuss Subklinische Mastitis; 2012 März 22-23; Grub, Deutschland. Gießen: DVG-Verlag; 2012.

^AValentin-Weigand P. Allgemeine Bakteriologie. In: Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9. Aufl. Stuttgart, Enke-Verlag; 2011. p. 84-129.

^BValentin-Weigand P. Grampositive Kokken. In: Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9. Aufl. Stuttgart, Enke-Verlag; 2011. p. 256-70.

Waage S, Jonsson P, Franklin A. Evaluation of a cow-side test for detection of gram-negative bacteria in milk from cows with mastitis. *Acta Vet Scand.* 1994; 35:207-12.

Wallemacq H, Bedoret D, Pujol J, Desmet C, Drion PV, Farnir F, et al. CD40 triggering induces strong cytotoxic T lymphocyte responses to heat-killed *Staphylococcus aureus* immunization in mice: a new vaccine strategy for staphylococcal mastitis. *Vaccine* 2012; 30: 2116-24.

Watson DL, Lascelles AK. The influence of systemic immunization during mammary involution on subsequent antibody production in the mammary gland. *Res Vet Sci.* 1975; 18: 182-5.

Watson DL. Evaluation of attenuated live *Staphylococcal* mastitis vaccine in lactating heifers. *J Dairy Sci.* 1984; 67: 2608-13.

Watson DL. *Staphylococcal* mastitis vaccine. *Vaccine* 1992; 10: 359.

Wendt K, Lotthammer KH, Fehlings K, Spohr M. Handbuch Mastitis. 1. Aufl. Osnabrück: Kamlage Verlag; 1998.

Wenz JR, Barrington GM, Garry FB, Ellis RP, Magnuson RJ. *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes and virulence genes and clinical coliform mastitis. J Dairy Sci. 2006; 89: 3408-12.

Wieler LH, Ewers C, Selbitz HJ. Enterobacteriaceae. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre Hrsg. 9. Aufl. Stuttgart, Enke-Verlag; 2011. p. 186-217.

Wilson MR, Duncan JR, Heistand F, Brown P. The influence of preparturient intramammary vaccination on immunoglobulin levels in bovine mammary secretions. Immunol. 1972; 23: 313-20.

Wilson MR. The influence of preparturient intramammary vaccination on immunoglobulin levels in bovine mammary secretions. Antibody activity and protective value against *Escherichia coli* enteric infections. Immunol. 1972; 23: 947-55.

Wilson DJ, González RN, Das HH. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: prevalence and effects on somatic cell count and milk production. J Dairy Sci. 1997; 80: 2592-8.

Wilson DJ, Gonzáles RN. Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis. Vet Clin North Am Food Anim. 2003; 19: 187-97.

^AWilson DJ, Mallard BA, Burton JL, Schukken YH, Grohn YT. Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change and clinical effects following intramammary *Escherichia coli* challenge for J5 vaccine and control cows. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14: 693-9.

^BWilson DJ, Grohn YT, Bennett GJ, González RN, Schukken YH, Spatz J. Comparison of J5 vaccinates and controls for incidence, etiologic agent, clinical severity and survival in the herd following naturally occurring cases of clinical mastitis. *J Dairy Sci.* 2007; 90: 4282-8.

Wilson DJ, Grohn YT, Bennett GJ, González RN, Schukken YH, Spatz J. Milk production change following clinical mastitis and reproductive performance compared among J5 vaccinated and control dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2008; 91: 3869-79.

Wilson DJ, Mallard BA, Burton JL, Schukken YH, Grohn YT. Association of *Escherichia coli* J5-specific serum antibody responses with clinical mastitis outcome for J5 vaccinate and control dairy cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 2009; 16: 209-17.

Winter P. Untersuchung im Labor. In: Winter P, Hrsg. *Praktischer Leitfaden Mastitis.* Stuttgart: Parey-Verlag; 2009. p. 70-94.

Yancey RJ. Vaccines and diagnostic methods for bovine mastitis: fact and fiction. *Adv Vet Med.* 1999; 41: 257-73.

Zecconi A, Hamann J, Bronzo V, Moroni P, Giovannini G, Piccinini R. Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 480: 287-93.

Zecconi A. *Staphylococcus aureus* mastitis: what we need to know to control them. *Israel J Vet Med.* 2010; 65: 93-9.

9 Anhang

Anlage 1: Deskriptive Statistik zum Merkmal Somatische Zellzahl ($\cdot 10^3$)/ml

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	39 263 112 - 1010 6 3355	40 39 14,25 - 383 6 2946	p = 0,015
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 51 24 - 151 9 2465	36 18 11 - 34 6 2668	p = 0,005
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 185 62 - 981 15 2947	40 35 20 - 74 7 1615	p = 0,0001
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	39 67 30 - 298 9 1950	36 19 12 - 37 5 645	p = 0,0001
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 110 27 - 787 13 2596	35 20 13 - 39 7 1618	p = 0,001
Signifikanz- Prüfung zwischen den Gruppen zum Entnahme- zeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,0001 p = 0,380 p = 0,001 p = 0,040 p = 0,001 p = 0,322 p = 0,091 p = 0,018 p = 0,166 p = 0,468	p = 0,010 p = 0,644 p = 0,024 p = 0,050 p = 0,003 p = 0,585 p = 0,277 p = 0,018 p = 0,022 p = 0,666	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 2: Deskriptive Statistik für das Merkmal Gesamtkeimzahl (KBE/ml)

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	18 19750 2950 - 832000 200 63000000	15 23500 4550 - 270000 600 38500000	p = 0,674
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	20 1600 1000 - 6750 190 20000	3 600 300 - 52000 300 52000	p = 0,180
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	30 10000 2000 - 40000 200 110000	10 14500 4250 - 65000 2000 800000	p = 0,933
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	16 15000 2750 - 52500 600 700000	5 3000 1000 - 52500 1000 100000	p = 0,180
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	11 10000 8000 - 20000 300 100000	6 3150 2425 - 5100 2200 6000	nicht auswertbar
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmzeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,002 p = 0,240 p = 0,557 p = 0,368 p = 0,006 p = 0,008 p = 0,005 p = 0,619 p = 0,813 p = 0,784	p = 0,123 p = 0,437 p = 0,073 p = 0,022 p = 0,236 p = 0,294 p = 0,439 p = 0,125 p = 0,065 p = 0,855	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 3: Deskriptive Statistik zum Keim-Score

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 0 0 - 3 0 9	40 0 0 - 3 0 9	p = 0,698
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 0,5 0 - 3 0 5	36 0 0 - 0 0 4	p = 0,007
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 3 0,25 - 5 0 5	39 0 0 - 3 0 5	p = 0,0001
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	38 0 0 - 3 0 5	36 0 0 - 0 0 4	p = 0,004
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 0 0 - 1 0 5	36 0 0 - 0 0 3	p = 0,598
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmezeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,599 p = 0,007 p = 0,877 p = 0,125 p = 0,016 p = 0,760 p = 0,048 p = 0,009 p = 0,0001 p = 0,110	p = 0,009 p = 0,270 p = 0,018 p = 0,039 p = 0,104 p = 0,754 p = 0,535 p = 0,173 p = 0,284 p = 0,745	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 4: Deskriptive Statistik für das Merkmal CRP in ng/ml

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1.-3. Quartil Minimum Maximum	39 480 290 - 760 90 8920	40 600 458 - 935 210 1470	39 350 160 - 560 80 2190	1:2 p=0,027 1:3 p=0,005 2:3 p=0,0001
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 520 374 - 784 91 1051	40 487 276 - 1261 167 6720	36 197 104 - 282 63 2909	1:2 p=0,742 1:3 p=0,0001 2:3 p=0,0001
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 518 235 - 1318 170 2865	40 780 603- 1380 412 6177	40 230 126 - 328 87 1056	1:2 p=0,195 1:3 p=0,0001 2:3 p=0,0001
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 424 303 - 634 132 1214	36 1096 731 - 2411 334 6364	36 192 146 - 376 101 1001	1:2 p=0,0001 1:3 p=0,0001 2:3 p=0,0001
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 390 226 - 749 146 3051	36 619 326 - 1388 141 5876	36 223 129 - 299 58 1283	1:2 p=0,026 1:3 p=0,001 2:3 p=0,0001
Signifikanz- Prüfung zwischen den Gruppen zum Entnahme- zeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,537 p = 0,453 p = 0,607 p = 0,477 p = 0,762 p = 0,233 p = 0,161 p = 0,268 p = 0,175 p = 0,607	p = 0,194 p = 0,003 p = 0,001 p = 0,735 p = 0,002 p = 0,001 p = 0,546 p = 0,157 p = 0,075 p = 0,015	p = 0,010 p = 0,049 p = 0,056 p = 0,021 p = 0,248 p = 0,322 p = 0,600 p = 0,632 p = 0,712 p = 0,673	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 5: Deskriptive Statistik für das Merkmal Endotoxin in EU/ml

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 50 50 - 50 50 262	40 50 50 - 458 50 37354	40 50 50 - 1427 50 48632	1:2 p=0,001 1:3 p=0,001 2:3 p=0,631
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 10 5 - 45 5 440	40 255 62 - 495 30 2621	36 552 47 - 11171 5 43378	1:2 p=0,0001 1:3 p=0,0001 2:3 p=0,012
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 6 5 - 24 5 4611	40 1770 162 - 18880 36 34738	40 120 43 - 1511 5 21405	1:2 p=0,0001 1:3 p=0,0001 2:3 p=0,150
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 30 5 - 344 5 32121	36 449 41 - 3121 27 246880	36 61 40 - 257 5 1735	1:2 p=0,090 1:3 p=0,670 2:3 p=0,018
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 31 8 - 18578 5 167120	36 152 56 - 1145 23 47898	35 75 44 - 153 8 38446	1:2 p = 0,975 1:3 p = 0,255 2:3 p = 0,002
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmezeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,0001 p = 0,0001 p = 0,0010 p = 0,100 p = 0,225 p = 0,302 p = 0,006 p = 0,032 p = 0,0001 p = 0,135	p = 0,592 p = 0,008 p = 0,665 p = 0,708 p = 0,008 p = 0,157 p = 0,677 p = 0,252 p = 0,013 p = 0,361	p = 0,633 p = 0,214 p = 0,044 p = 0,175 p = 0,114 p = 0,014 p = 0,029 p = 0,317 p = 0,389 p = 0,687	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 6: Deskriptive Statistik für spezifische Antikörper IgG₁ gegen LCV-*E. coli* in RE/ml

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 107,8 64,2 - 176,6 24,5 596,4	10 81,6 73 - 127,8 23,5 389,2	p = 0,093
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 73,1 58,4 - 173 40,7 213,6	9 322 200,7 - 405,2 154,5 703,6	p = 0,008
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 131,7 81,6 - 626,9 27,3 2726	10 608,9 451,4 - 1034 212,4 2039,2	p = 0,093
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 134,1 91,2 - 210,8 47,1 303,8	9 507,9 245,1 - 561,4 234,1 2675,3	p = 0,008
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 81,3 41,9 - 208,6 29,9 427,7	9 240,7 120,4 - 477,7 85,3 676,3	p = 0,008
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmzeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,496 p = 0,406 p = 0,364 p = 0,545 p = 0,151 p = 0,174 p = 0,821 p = 0,650 p = 0,226 p = 0,257	p = 0,003 p = 0,0001 p = 0,001 p = 0,009 p = 0,009 p = 0,233 p = 0,453 p = 0,327 p = 0,009 p = 0,171	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 7: Deskriptive Statistik für spezifische Antikörper IgG₁ gegen SCV-*E. coli* in RE/ml

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 104,6 66,3 - 208 29,2 472,3	10 92,8 72,6 - 154,7 29,2 361,5	p = 0,214
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 76,8 48,9 - 133 36,5 154,9	9 281,8 179,7 - 444,9 141,3 680	p = 0,008
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 119,4 70,5 - 621,3 32 3326,5	10 568,5 377,1 - 1046 177,8 2520,1	p = 0,074
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 127,3 70,8 - 188,8 54,3 201,9	9 436,6 251,3 - 512 208,5 2832	p = 0,008
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 87,3 38,8 - 165,5 30,5 342,5	9 173 129,5 - 395,4 66,2 652,6	p = 0,008
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmepunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,326 p = 0,406 p = 1,000 p = 0,545 p = 0,199 p = 0,070 p = 1,000 p = 0,597 p = 0,162 p = 0,290	p = 0,003 p = 0,0001 p = 0,001 p = 0,060 p = 0,027 p = 0,310 p = 0,270 p = 0,165 p = 0,006 p = 0,058	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 8: Deskriptive Statistik für spezifische Antikörper IgG₂ gegen LCV-*E. coli* in RE/ml

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 28,5 20,4 - 121,3 9,5 165	10 32,9 20,4 - 93,3 8,4 182,4	p = 1,000
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 22,7 13,6 - 71,5 8,2 87,4	9 87,4 70,7 - 107,3 58,7 232,1	p = 0,008
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 70,6 22,7 - 162,3 5,3 935,6	10 195,8 143,7 - 306,6 61,4 391,3	p = 0,074
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 40,8 12,7 - 108,2 2,7 136,1	9 95,8 56 - 350,9 31,4 701,8	p = 0,028
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 28,8 8,8 - 52,3 5,3 147,2	9 80,3 50,5 - 172,4 40,3 255,1	p = 0,011
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmezeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,290 p = 0,364 p = 0,940 p = 0,406 p = 0,186 p = 0,326 p = 0,821 p = 0,450 p = 0,104 p = 0,496	p = 0,034 p = 0,001 p = 0,022 p = 0,060 p = 0,009 p = 0,627 p = 0,825 p = 0,236 p = 0,022 p = 0,566	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 9: Deskriptive Statistik für spezifische Antikörper IgG₂ gegen SCV-*E. coli* in RE/ml

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 28,5 25,5 - 85,8 13,6 181,4	10 37,6 28,7 - 80,1 12,5 136,9	p = 0,515
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 26,6 20,4 - 52,9 17,8 90,8	9 80,5 68,5 - 134,5 49,8 253,9	p = 0,008
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 62,3 33,1 - 169,6 16,9 950,9	10 239,2 146,2 - 317,3 63,1 357,6	p = 0,074
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 38,4 21 - 94 16,6 121,2	9 119,2 66,2 - 347,5 47,2 901	p = 0,008
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 33,8 17,5 - 46 13,8 100,6	9 87,4 44,1 - 164,8 38 243,9	p = 0,011
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmepunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,449 p = 0,199 p = 0,940 p = 0,705 p = 0,112 p = 0,449 p = 0,705 p = 0,326 p = 0,049 p = 0,427	p = 0,018 p = 0,001 p = 0,006 p = 0,022 p = 0,014 p = 0,402 p = 0,757 p = 0,221 p = 0,014 p = 0,354	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 10: Deskriptive Statistik für Haptoglobin in mg/ml

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 0,175 0,0028 - 0,072 0,001 0,306	10 0,004 0,003 - 0,5535 0,003 10,049	p = 0,767
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 0,01 0,01 - 0,01 0,01 0,01	9 0,01 0,01 - 0,01 0,01 566,63	p = 0,317
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 0,01 0,01 - 0,01 0,01 4,96	10 0,01 0,01 - 0,01 0,01 20,65	p = 0,655
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 0,01 0,01 - 0,01 0,01 0,01	9 0,01 0,01 - 0,01 0,01 0,01	p = 1,000
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 0,01 0,01 - 0,01 0,01 0,01	9 0,01 0,01 - 0,01 0,01 0,01	p = 1,000
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmepunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,679 p = 0,968 p = 0,679 p = 0,679 p = 0,317 p = 1,000 p = 1,000 p = 0,317 p = 0,317 p = 1,000	p = 0,140 p = 0,133 p = 0,231 p = 0,252 p = 0,878 p = 0,317 p = 0,346 p = 0,343 p = 0,371 p = 1,000	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 11: Deskriptive Statistik der Score-Werte des Eutergesundheitsstatus der Euterviertel
(1 = eutergesund; 2 = latente Infektion möglich; 3 = unspezifische Mastitis;
4 = subklinische Mastitis; 5 = Kontamination)

Gruppe	Deskriptive Statistik	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 3	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	39 3 3 - 4 1 4	40 1 1 - 3 1 4	p = 0,001
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 2 1 - 4 1 4	36 1 1 - 1 1 4	p = 0,029
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 4 2 - 4 1 4	40 1 1 - 2 1 4	p = 0,0001
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	38 2 1 - 4 1 4	36 1 1 - 1 1 4	p = 0,019
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	40 2,5 1 - 3,75 1 4	35 1 1 - 1 1 4	p = 0,002
Signifikanzprüfung zwischen den Gruppen zum Entnahmezeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,023 p = 0,436 p = 0,084 p = 0,019 p = 0,005 p = 0,770 p = 0,975 p = 0,018 p = 0,004 p = 0,710	p = 0,005 p = 0,170 p = 0,021 p = 0,003 p = 0,119 p = 0,584 p = 0,985 p = 0,307 p = 0,101 p = 0,549	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 12: Deskriptive Statistik zur MLP-Zellzahl im zweiten und vierten Laktationsmonat (*10³/ml) nach Versuchsende

Gruppe	Deskriptive Statistik	2. Laktationsmonat	4. Laktationsmonat	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 134 41,75 - 295,25 20 4647	10 40 20,75 - 751,25 17 2059	p = 0,445
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	9 32 24 - 259,5 20 382	9 40 28 - 113,5 15 217	p = 0,767
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 60,5 32,75 - 261,25 22 1228	9 85 28,5 - 181 18 737	p = 0,722
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	9 27 16 - 41 13 75	9 32 25 - 65,5 21 136	p = 0,033
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	9 37 25,5 - 181 21 383	8 60 41 - 213,75 24 1041	p = 0,484
Signifikanz- Prüfung zwischen den Gruppen zum Entnahme- zeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,152 p = 0,473 p = 0,005 p = 0,253 p = 0,270 p = 0,157 p = 0,691 p = 0,020 p = 0,540 p = 0,070	p = 0,253 p = 0,567 p = 0,191 p = 0,790 p = 0,566 p = 0,452 p = 0,289 p = 0,199 p = 0,923 p = 0,092	p ≤ 0,05 = signifikant

Anlage 13: Deskriptive Statistik zu den MLP-Zellzahlen (*10³/ml)
der Laktationsmonate 3, sowie 5 bis 12

Gruppe			3. LM	5. LM	6. LM	7. LM	8. LM	9. LM	10. LM	11. LM	12. LM	
Kontrolle	N	Gültig	10	10	7	7	7	7	5	5	2	
		Fehlend	30	30	33	33	33	33	35	35	38	
		Median	209,00	102,00	139,00	125,00	203,00	165,00	125,00	98,00	533,00	
		Minimum	29	21	32	18	24	41	30	24	27	
		Maximum	1.188	3.757	299	570	545	877	843	874	1.039	
		Perzentile	25	38,00	42,75	40,00	49,00	133,00	87,00	36,50	37,00	27,00
			50	209,00	102,00	139,00	125,00	203,00	165,00	125,00	98,00	533,00
			75	1.075,25	479,25	242,00	447,00	329,00	250,00	487,50	747,50	1.039,00
	Gruppe A	N	Gültig	9	9	9	9	9	8	6	5	5
			Fehlend	31	31	31	31	31	32	34	35	35
		Median	41,00	47,00	81,00	76,00	86,00	65,50	94,00	61,00	222,00	
		Minimum	22	23	22	28	40	33	38	38	38	
		Maximum	271	1.034	746	250	898	1.001	1.465	407	273	
		Perzentile	25	30,50	27,00	40,00	42,50	46,00	38,50	61,25	49,50	94,50
			50	41,00	47,00	81,00	76,00	86,00	65,50	94,00	61,00	222,00
			75	177,50	210,50	261,00	203,00	173,50	94,50	453,25	271,50	249,00
Gruppe B		N	Gültig	9	9	8	8	8	5	3	2	0
			Fehlend	31	31	32	32	32	35	37	38	40
		Median	58,00	75,00	76,00	102,00	112,00	268,00	203,00	371,50		
		Minimum	14	28	21	11	29	44	45	170		
		Maximum	812	155	182	480	730	414	1.288	573		
		Perzentile	25	17,00	35,50	38,25	43,25	61,00	93,00	45,00	170,00	
			50	58,00	75,00	76,00	102,00	112,00	268,00	203,00	371,50	
			75	323,00	116,50	133,75	217,75	224,50	351,50	1.288,00	573,00	
	Gruppe C	N	Gültig	9	9	9	9	9	7	7	6	6
			Fehlend	31	31	31	31	31	33	33	34	34
		Median	46,00	39,00	51,00	49,00	90,00	82,00	126,00	108,00	115,00	
		Minimum	14	24	30	20	18	25	31	64	30	
		Maximum	117	123	122	253	497	247	1.495	581	418	
		Perzentile	25	23,00	29,00	30,50	30,00	47,50	41,00	62,00	86,50	56,25
			50	46,00	39,00	51,00	49,00	90,00	82,00	126,00	108,00	115,00
			75	88,50	82,00	69,50	99,00	148,00	154,00	996,00	435,50	277,75
Gruppe D		N	Gültig	8	8	8	8	7	6	2	0	0
			Fehlend	32	32	32	32	33	34	38	40	40
		Median	83,00	91,50	160,50	130,50	231,00	146,00	475,00			
		Minimum	25	32	39	46	40	34	293			
		Maximum	1.417	860	1.685	561	397	345	657			
		Perzentile	25	35,75	49,50	48,00	72,50	82,00	88,75	293,00		
			50	83,00	91,50	160,50	130,50	231,00	146,00	475,00		
			75	1.000,50	212,50	342,25	299,75	353,00	224,25	657,00		

Anlage 14: Deskriptive Statistik zur MLP-Zellzahl vor dem Trockenstellen (*10³/ml)

Gruppe	Deskriptive Statistik	Vor dem ersten Trockenstellen	Vor dem zweiten Trockenstellen	Signifikanzprüfung zwischen den Zeitpunkten
Kontroll-Gruppe K	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 380,5 302 - 510 269 6020	5 98 38,5 - 856,5 27 1486	p = 0,345
Gruppe A (LCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 87,5 57,75 - 240,25 44 862	9 151 79,5 - 222,5 68 325	p = 0,260
Gruppe B (SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 102 46,75 - 153 45 182	8 219 78,25 - 502 45 730	p = 0,050
Gruppe C (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i>)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 132 46,75 - 253 28 454	9 187 95 - 400,5 20 1495	p = 0,314
Gruppe D (LCV- <i>E. coli</i> + SCV- <i>E. coli</i> + 20 % SO)	n Median 1. - 3. Quartil Minimum Maximum	10 141,5 52,75 - 317,75 33 484	6 267,5 113 - 423 107 657	p = 0,116
Signifikanz- Prüfung zwischen den Gruppen zum Entnahme- zeitpunkt	K : A K : B K : C K : D A : B A : C A : D B : C B : D C : D	p = 0,002 p = 0,0001 p = 0,001 p = 0,006 p = 0,650 p = 0,762 p = 0,650 p = 0,450 p = 0,450 p = 0,762	p = 0,739 p = 0,464 p = 0,549 p = 0,201 p = 0,501 p = 0,627 p = 0,111 p = 0,923 p = 0,699 p = 0,724	p ≤ 0,05 = signifikant

Danksagung

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. M. Krüger und Herrn Prof. Dr. A. Sobiraj für die Vergabe des Themas meiner Doktorarbeit und die stets freundliche Betreuung.

Ein großes Dankeschön an Herrn Dr. L. Jäkel für die Betreuung des Versuches im Bestand und die immer verlässlichen Probenentnahmen.

Ein großer Dank auch an die Mitarbeiter des Institutes für Bakteriologie und Mykologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig sowie an Biocheck Leipzig für die große und zuverlässige Hilfe bei der Analyse der angefallenen Proben.

Weiterhin möchte ich Herrn A. Richter für die zeitraubende Unterstützung bei der statistischen Auswertung herzlich danken.

Nicht zuletzt auch ein Dankeschön an meine Familie, Freunde und Kollegen, die mir in schweren Zeiten den nötigen Antrieb gaben und mich auch in angespannten Situationen ertrugen.